ORSAY
n° d'ordre : 252

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

THESE

présentée

Pour obtenir

Le GRADE de DOCTEUR D'UNIVERSITE

SPECIALITE : SCIENCES NATURELLES

PAR

Madame MAHE née THEPAULT Marie-Françoise

SUJET : ANALYSE BIOCHIMIQUE DE DEUX VARIANTS DE CASEINE BOVINE

soutenue le 21 OCTOBRE 1981 devant la Commission d'examen

MM. PATTE J.C Président

RIBADEAU-DUMAS B.

MERCIER J.C

GROSCLAUDE F.

ORSAY
n° d'ordre : 252

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

THESE

présentée

Pour obtenir

Le GRADE de DOCTEUR D'UNIVERSITE

SPECIALITE : SCIENCES NATURELLES

PAR

Madame MAHE née THEPAULT Marie-Françoise

SUJET : ANALYSE BIOCHIMIQUE DE DEUX VARIANTS DE CASEINE BOVINE

soutenue le 21 OCTOBRE 1981 devant la Commission d'examen

MM. PATTE J.C Président

ROIBADEAU Dumas B.

MERCIER J.C

GROSCLAUDE F.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

REMERCIEMENTS

Je remercie sincèrement M. J-C. PATTE d'avoir bien voulu présider le Jury de cette Thèse ainsi que MM. B. RIBADEAU-DUMAS et J-C. MERCIER d'avoir accepté de faire partie du Jury.

Je remercie tout particulièrement M. F.GROSCLAUDE, qui au Laboratoire de Génétique biochimique a guidé ces recherches. Ses conseils et ses encouragements ont permis de mener à bien ce travail et je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance.

Je n'oublie pas que c'est grâce à M. J-P. ACCOLAS du Département de Technologie animale que j'ai pu obtenir des échantillons de lait de République populaire de Mongolie.

Je suis reconnaissante à M. B.C. DAS et à M. J-C. MERCIER pour leur collaboration ainsi qu'à tous ceux qui m'ont fait bénéficier de leurs conseils et de leurs encouragements au sein de notre Laboratoire.

Mes remerciements vont enfin à Josette DELAVAULT pour la dactylographie, et à MM. G. RUFFET et S. TIGNOUX pour l'aide apportée à la réalisation manuelle de cette Thèse.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547318_0025

TABLE DES MATIERES.

Pages.

I. AVANT-PROPOS.

II. ETAT DES CONNAISSANCES SUR LA BIOCHIMIE DES LACTOPROTEINES BOVINES..... 1

A. CASEINES..... 1

1. Historique 1

2. Structure primaire des 4 espèces de caséines : α_{s1}, α_{s2}, β , κ 2

2.1. Séquence des acides aminés 2

2.2. Groupements prosthétiques 3

3. Interprétation de l'hétérogénéité observée en électrophorèse 4

3.1. Fractions principales 4

3.2. Fractions dites "mineures"..... 5

4. Code de phosphorylation..... 5

B. PROTEINES DU LACTOSERUM..... 8

1. Protéines principales : α-lactalbumine, β-lactoglobuline. 8

2. Autres protéines..... 9

III. POLYMORPHISME GENETIQUE DES LACTOPROTEINES BOVINES..... 9

1. Principes 9

2. Inventaire des variants électrophorétiques des lactoprotéines..... 10

2.1. Mise en évidence du polymorphisme..... 10

2.1.1. Caséines..... 10

2.1.2. Protéines du lactosérum 11

2.2. Caséines 12

2.3. Protéines du lactosérum 12

.../...

3. Etroite liaison des locus de structure des 4 caséines bovines..... 13

4. Analyse biochimique des variants électrophorétiques des caséines α_{s1}, β et κ , de l' α-lactalbumine et de la β-lactoglobuline..... 14
4.1. Phylogénie des variants électrophorétiques..... 15
4.2. Variants électrophorétiques et code de phosphorylation des caséines 15

IV. MATERIEL ET METHODES..... 17

1. Origine des caséines 17

2. Rappels sur les électrophorégrammes des variants de la caséine α_{s2} 17

3. Préparation des fractions de la caséine α_{s2}..... 18
3.1. Préparation de la caséine entière 18
3.2. Préparation chimique de la caséine α_{s2} brute..... 18
a. Méthode de THOMPSON et KIDDY 18
b. Méthode de ZITTLE et CUSTER 18
3.3. Séparation des fractions de la caséine α_{s2} sur DEAE Cellulose..... 19
3.4. Purification des fractions de caséine α_{s2} sur hydroxyapatite 19

4. Réduction et S-carboxyméthylation 19

5. Fragmentation chimique ou enzymatique de la caséine α_{s2} 20
5.1. Hydrolyse par le bromure de cyanogène (CNBr)..... 20
5.2. Hydrolyses par les enzymes 20
5.2.1. Trypsine..... 20
5.2.2. Thermolysine..... 20

6. Purification des peptides 21
6.1. Techniques de chromatographie sur colonne 21
6.1.1. Filtration moléculaire 21
6.1.2. Chromatographie sur échangeur d'ions..... 21

.../...

6.2. Recherche des peptides par électrophorèse et chromatographie sur papier 22
6.2.1. Technique d'électrophorèse sur papier 22
6.2.2. Technique de chromatographie sur papier ... 22
6.2.3. Révélation non spécifique des peptides 23
6.2.4. Révélation spécifique de certains peptides. 23

7. Détermination des compositions en acides aminés..... 23
7.1. Hydrolyse acide..... 23
7.2. Dosage des acides aminés par analyseur..... 24

8. Détermination de séquences d'acides aminés 24
8.1. Principes 24
8.2. Séquences N-etC-terminales : action des exopeptidases 24
8.3. Dégradation récurrente d'Edman 25
8.4. Spectrométrie de masse 26

9. Recherche et dosage des groupements prosthétiques..... 26
9.1. Recherche des acides sialiques 26
9.2. Dosage des groupements phosphate 26
9.2.1. Hydrolyse ménagée 27
9.2.2. Dosage colorimétrique 27

V. CARACTERISATION DU VARIANT $\alpha_{s2}D$..... 27

1. Ligne directrice de l'étude 27
2. Préparation des fractions 2, 3 et 4 de la caséine α_{s2} 28
2.1. Séparation du complexe α_{s2} + κ à partir de la caséine entière 28
2.2. Fractionnement du complexe des caséines α_{s2} et κ sur colonne de DEAE Cellulose 29
2.3. Examen, par électrophorèse,des fractions issues de DEAE Cellulose 29
2.4. Préparation d'une réserve de caséine α_{s2} correspondant à la bande 3..... 30

.../...

3. Analyse biochimique de la fraction 3 du variant $\alpha_{s2}D$..... 30
3.1. Composition en acides aminés 30
3.2. Dosage du phosphore 30
3.3. Identification des extrémités N- et C-terminales..... 31
3.4. Etude des peptides CNBr..... 31
3.4.1. Préparation, composition en acides aminés et éléments de structure des peptides CNBr... 31
3.4.2. Recherche et dosage de phosphore 33
3.5. Structure du peptide CN5 contenant l'altération spécifique du variant $\alpha_{s2}D$..... 33
3.5.1. Préparation spécifique du peptide CN5..... 33
3.5.2. Hydrolyse trypsique de CN5 et purification des peptides 34
3.5.3. Conclusions..... 35

VI. CARACTERISATION DU VARIANT $\alpha_{s2}C$..... 35

1. Ligne directrice d'étude du variant 35

2. Préparation de la fraction lente L..... 36
2.1. Séparation du complexe des caséines α_{s1}, α_{s2} et κ à partir de la caséine entière 36
2.2. Chromatographie du complexe α_{s1}, α_{s2} et κ sur colonne de DEAE Cellulose..... 36

3. Analyse biochimique de la fraction L..... 36
3.1. Composition en acides aminés 36
3.2. Dosage du phosphore 36
3.3. Etude des peptides CNBr de la fraction L..... 38
3.3.1. Séparation des peptides CNBr 38
3.3.2. Composition en acides aminés des peptides CNBr 38
3.3.3. Dosage du phosphore dans les peptides CNBr... 38
3.4. Préparation et analyse des peptides trypsiques de CN5..... 39
3.4.1. Obtention et séparation des peptides..... 39
3.4.2. Identification et analyse des peptides..... 39
3.5. Conclusions..... 41

.../...

4. Préparation de la fraction R..... 42
4.1. Préparation du complexe des caséines α_{s2} et κ .. 42
4.2. Chromatographie du complexe des caséines α_{s2} et κ sur colonne de DEAE cellulose..... 42

5. Analyse biochimique de la fraction R..... 43
5.1. Dosage du phosphore de la fraction R..... 43
5.2. Préparation et composition du peptide CN5 de la fraction R..... 43
5.3. Etude des peptides trypsiques du peptide CN5 (variant $\alpha_{s2}C$, fraction R)..... 44
5.3.1. Obtention et séparation des peptides..... 44
5.3.2. Identification et composition des peptides... 44
5.4. Conclusion de l'étude de la fraction R..... 45

6. Conclusion et discussion générale sur le variant $\alpha_{s2}C$..... 45

VII. RECHERCHE PRELIMINAIRE DES SITES DE PHOSPHORYLATION DIFFERENTIELLE DE LA CASEINE α_{s2}..... 46

1. Ligne directrice de l'étude..... 46

2. Purification des fractions 2, 3 et 4 du variant $\alpha_{s2}D$..... 46
2.1. Préparation chimique du complexe des caséines α_{s1}, et α_{s2}..... 46
2.2. Séparation des fractions de la caséine α_{s2} par chromatographie sur colonne de DEAE Cellulose..... 46
2.3. Purification des fractions de caséine α_{s2} par chromatographie sur hydroxyapatite..... 47
2.4. Dosage du phosphore dans les fractions 2, 3 et 4 de la caséine $\alpha_{s2}D$..... 47
2.5. Recherche qualitative des acides sialiques..... 48

3. Etude comparative des peptides CNBr des fractions 2, 3 et 4 de la caséine $\alpha_{s2}D$..... ...
3.1. Obtention et comparaison par electrophorese [illegible] peptides CNBr des fractions 2, 3 et 4..... 49

.../...

3.2. Recherche et dosage du phosphore dans les peptides CNBr des fractions 2, 3 et 4..... 49
3.3. Obtention et analyse des phosphopeptides trypsiques du CN5 des fractions 2, 3 et 4..... 49
3.4. Localisation dans le peptide CN5T4 du site de phosphorylation qui différencie les fractions 3 et 4 50

4. Discussion et conclusion..... 50

VIII. DISCUSSION ET CONCLUSION.....

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....

I. AVANT-PROPOS.

Les caséines - en particulier celles du lait de vache - ont fait l'objet, au cours de la dernière décennie, d'études approfondies, tant biochimiques que génétiques. Les principaux résultats ont été obtenus par deux Laboratoires de l'I.N.R.A., à JOUY-en-JOSAS, le Laboratoire de Recherches sur les Protéines, dirigé par B. RIBADEAU-DUMAS, et le Laboratoire de Génétique biochimique, dirigé par F. GROSCLAUDE.

C'est ainsi que la liaison génétique des loci de structure des caséines α_{s1}, β et κ a été démontrée, dès 1964 et 1965 par F. GROSCLAUDE et collaborateurs, qui ont procédé, dans les années suivantes, à un inventaire approfondi des variants électrophorétiques dans les nombreuses races Françaises. C'est ainsi également que l'établissement de la structure primaire des caséines α_{s1}, β et κ a été achevée par B. RIBADEAU-DUMAS, J-C. MERCIER et leurs collaborateurs, entre 1971 et 1973. Par ailleurs, la caractérisation biochimique des variants des caséines α_{s1}, β et κ, effectuée par F. GROSCLAUDE et ses collaborateurs, et à laquelle j'ai participé, a été effectuée pour l'essentiel entre les années 1969 et 1974.

Dans cet ensemble de travaux, une quatrième caséine, la caséine α_{s2}, considérée longtemps comme une caséine "mineure", avait été négligée. Cependant, la structure primaire de cette caséine devait être établie en 1977 par l'équipe de B. RIBADEAU-DUMAS, en particulier par G. BRIGNON. Parallèlement, en 1976, F. GROSCLAUDE observait le premier exemple de polymorphisme électrophorétique de cette caséine chez le Yak et le Zébu, et, à peu près à la même époque, un autre exemple de polymorphisme dans une race française de faible effectif, la Vosgienne. Il se trouve que le principal variant observé chez les yaks, $\alpha_{s2}C$, et le variant découvert en race Vosgienne, $\alpha_{s2}D$, présentaient tous deux des caractéristiques qui laissaient supposer qu'ils dérivaient d'un évènement génétique plus important, voire plus complexe qu'une simple mutation ponctuelle. Il a donc paru intéressant, pour compléter les données acquises sur les caséines bovines, et tenter d'expliquer les caractérisations particulières des variants $\alpha_{s2}C$ et $\alpha_{s2}D$, d'entreprendre une étude biochimique sur ces variants.

Ce travail qui m'a été confié, fait l'objet de la présente Thèse. Il a été effectué sous la direction de F.GROSCLAUDE.

.../...

Les chapitres II et III sont consacrés aux analyses bibliographiques relatives à l'étude entreprise, le chapitre IV à la description du Matériel et des Méthodes. Le chapitre V porte sur l'analyse du variant $\alpha_{s2}D$, le chapitre VI sur celle du variant $\alpha_{s2}C$. Les résultats acquis sur ce dernier variant nous ayant conduit à vérifier certaines caractéristiques du variant de référence, ces études font l'objet du chapitre VII. Enfin le chapitre VIII est consacré à la discussion et aux conclusions de notre travail.

II. ETAT DES CONNAISSANCES SUR LA BIOCHIMIE DES LACTOPROTEINES BOVINES.

La distinction que l'on fait classiquement, parmi les lactoprotéines, entre les caséines d'une part, et les protéines du lactosérum d'autre part, correspond à une différence d'état de ces protéines dans le lait, ainsi qu'à une différence de comportement lorsque l'on acidifie le lait vers pH 4,7 :

- Les caséines se trouvent en suspension dans la phase aqueuse sous forme de micelles stables (WAUGH et Von HIPPEL, 1956 ; WAUGH et al., 1970). Elles précipitent à pH 4,7.
- Les protéines du lactosérum sont solubles dans la phase aqueuse et le restent à pH 4,7.

On peut donc, après acidification, séparer les caséines par simple centrifugation.

A. CASEINES.

1. Historique.

Après les premiers travaux de LINDERSTROM-LANG et KODAMA (1925), il aura fallu plus d'un demi-siècle de recherches pour aboutir à la résolution du problème du nombre et de la nature des constituants formant la "caséine entière".

Première étape importante, MELLANDER (1939) obtient par électrophorèse en veine liquide une séparation de trois fractions, appelées α , β et γ , mais celles-ci ne correspondaient pas à des espèces protéiques pures.

En 1956, WAUGH et Von HIPPEL identifièrent la caséine κ par sa propriété de solubilité en présence de calcium. WAKE et BALDWIN, en 1961, introduirent la technique d'électrophorèse en gel d'amidon avec urée, dont le pouvoir de résolution fut amélioré par l'addition de β-mercaptoéthanol (NEELIN, 1964; WOYCHICK, 1964). L'électrophorégramme révéla alors l'existence d'environ 20 constituants protéiques dans la "caséine entière".

Après les années 1960, les caséines, au même titre que maintes autres protéines, ont pu être caractérisées et classées grâce à la mise en oeuvre de techniques perfectionnées d'analyse. C'est ainsi que l'utilisation de la chromatographie sur colonne de DEAE cellulose (MERCIER et al., 1968) a permis d'isoler les fractions qui avaient été identifiées par électrophorèse en gel d'amidon

. . . / . . .

avec urée et β-mercaptoéthanol. L'analyse de leur composition en acides aminés et de leurs résidus N- et C- terminaux suggéra qu'elles se répartissaient en 4 espèces protéiques différentes, qui sont devenues, dans la nomenclature acceptée aujourd'hui, les caséines α_{s1}, α_{s2}, β et κ.

Après purification, la structure primaire de ces caséines a été établie à l'aide d'appareils de plus en plus sophistiqués (analyseurs d'acides aminés, spectrophotomètre de masse, séquenceur) en faisant appel à toute une série d'enzymes et autres agents chimiques, certains d'entre eux relativement nouveaux à l'époque (anhydride maléique, thermolysine).

Parallèlement, des études génétiques ont confirmé que les quelques 20 fractions observées en électrophorèse étaient sous le contrôle génétique de 4 loci différents, qui correspondaient bien aux loci de structure des 4 espèces de caséines identifiées (ASCHAFFENBURG, 1961, 1963 ; KIDDY et al.,1964, 1966 ; GROSCLAUDE et al., 1965, 1978).

2. Structure primaire des 4 espèces de caséines α_{s1}, α_{s2}, β, κ.

2-1. Séquence des acides aminés.

La séquence des acides aminés des 4 espèces de caséines bovines a été définitivement établie par toute une équipe dans les laboratoires de B. RIBADEAU-DUMAS et F. GROSCLAUDE : MERCIER et al.,(1971) pour la caséine α_{s1}; RIBADEAU-DUMAS et al.,(1972) pour la caséine β ; MERCIER et al.,(1973) pour la caséine κ ; BRIGNON et al.,(1977) pour la caséine α_{s2}. A noter, pour quelques peptides, des contributions d'équipes étrangères (MATOBA et al., 1969, 1970 pour la caséine α_{s1} ; PETERSON et al., 1958 et MANSON et al., 1971 pour la caséine β ; JOLLES et al., 1968, 1970 ; DELFOUR et al., 1966 pour la caséine κ. (Tableau 1).

Les caséines α_{s1} et β sont caractérisées par la prédominance de résidus dicarboxyliques et de résidus apolaires, une forte teneur en proline et l'absence de cystéine. Des 4 caséines, la caséine α_{s2} est celle qui a la plus faible hydrophobicité dans l'échelle de BIGELOW (1967) ; sa teneur en proline est la plus faible, mais les résidus basiques y sont les plus nombreux. Comme la caséine κ, elle possède 2 résidus cystéyle, alors que les caséines α_{s1} et β en sont dépourvues.

.../...

Protéines	Teneur moyenne en g/l	% du total des caséines (a)	Nombre de résidus d'acides aminés	Masses moléculaires	Groupements prosthétiques		Cause de l'hétérogénéité électrophorétique à pH 8,6
					Nombre de groupements phosphate/mole	Présence de sucres	
Caséine α_{s1}	12	38	199	23616	8-9 (b)	-	groupements phosphate
Caséine α_{s2}	3	11	207	24350	10-13	-	groupements phosphate
Caséine β	12	38	209	23982	5	-	-
Caséine κ	4	13	169	19023	1-2 (c)	+ (d)	groupements phosphate et acides sialiques
α-Lactalbumine	0,7	-	123	14180	-	- (e)	- (e)
β-Lactoglobuline	3	-	162	18367	-	-	-

Tableau 1. Quelques caractéristiques des lactoprotéines des bovins.

a) Selon DAVIES et LAW (1977)
b) Il existe 9 groupements phosphate dans α_{s0} (MANSON et al, 1977).
c) Une des fractions (K4) comporte 2 groupements phosphate (VREEMAN et al., 1977).
d) Mise en évidence par PUJOLLE et al.(1966) ; SCHMIDT et al. (1966). VREEMAN et al. (1977) et DOI et al. (1978) ont trouvé de 0 à 4 acides N-acétyl neuraminiques par bande de caséine κ.
e) 3 à 5 % des chaînes d' α-lactalbumine comportent des sucres (BARMAN, 1970 ; HOPPER et al., 1973).

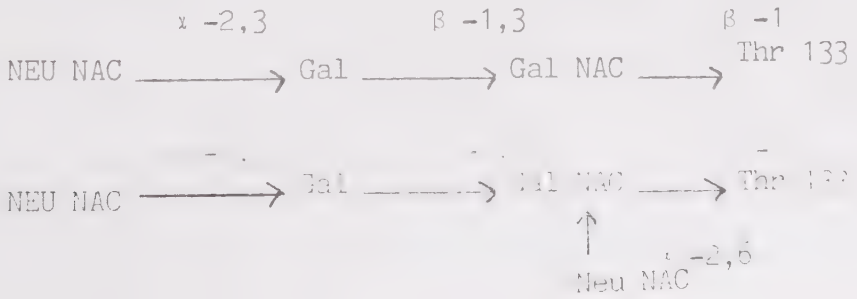
La caséine κ présente la particularité de pouvoir être hydrolysée par la présure au niveau de la liaison Phe-Met en position 105-106 de la chaîne polypeptidique (WAKE, 1957). Cette hydrolyse sélective libère un fragment N-terminal, appelé "paracaséine" κ , et un segment C-terminal hétérogène : le "caséinomacropeptide" (CMP). Cette phase primaire enzymatique précède la déstabilisation des micelles et par voie de conséquence la coagulation du lait (LINDERSTROM-LANG, 1929 ; WAUGH et al., 1956).

Ces caséines comportent peu de structure en hélice α (HERSKOVITS, 1966 ; BLOOMFIELD et al,1975) et leur structure tertiaire est assez lâche, ce qui explique pourquoi elles sont facilement attaquées par des enzymes protéolytiques (SCHMIDT, 1969 ; NOELKEN et al., 1968). Elles polymérisent aisément grâce à des interactions hydrophobes (SCHMIDT et al., 1964 ; LESLIE et al., 1969 ; HOAGLAND et al., 1971). C'est pourquoi la dépolymérisation complète des caséines α_{s2} et κ nécessite l'emploi simultané d'urée et de β-mercaptoéthanol en électrophorèse sur gel.

2-2. Groupements prosthétiques.

Les 4 espèces de caséines sont des phosphoprotéines. Les groupements phosphate sont liés de manière covalente aux radicaux hydroxyles des résidus séryle et thréonyle par une liaison du type monoester (THOMPSON,1971; Mc KENZIE, 1971).

Seule la caséine κ est glycosylée chez la vache. L'essentiel des glucides est constitué par le galactose, la N-acétylgalactosamine, l'acide N-acétyl neuraminique (JOLLES et al., 1962 ; WHEELCOCK et al., 1969). Selon FOURNET et al.(1975, 1979), on ne trouverait dans la caséine κ qu'une seule chaîne polysaccharidique fixée à la chaîne polypeptidique par l'intermédiaire d'une liaison O-glycosidique vraisemblablement sur le résidu Thr 131 / ou Thr 133 (JOLLES et al., 1973). Cette chaîne plus ou moins longue possèderait un nombre plus ou moins élevé de résidus N-acétylneuraminyle liés au galactose et/ou à la N-acétylgalactosamine (FOURNET et al., 1979).



.../..

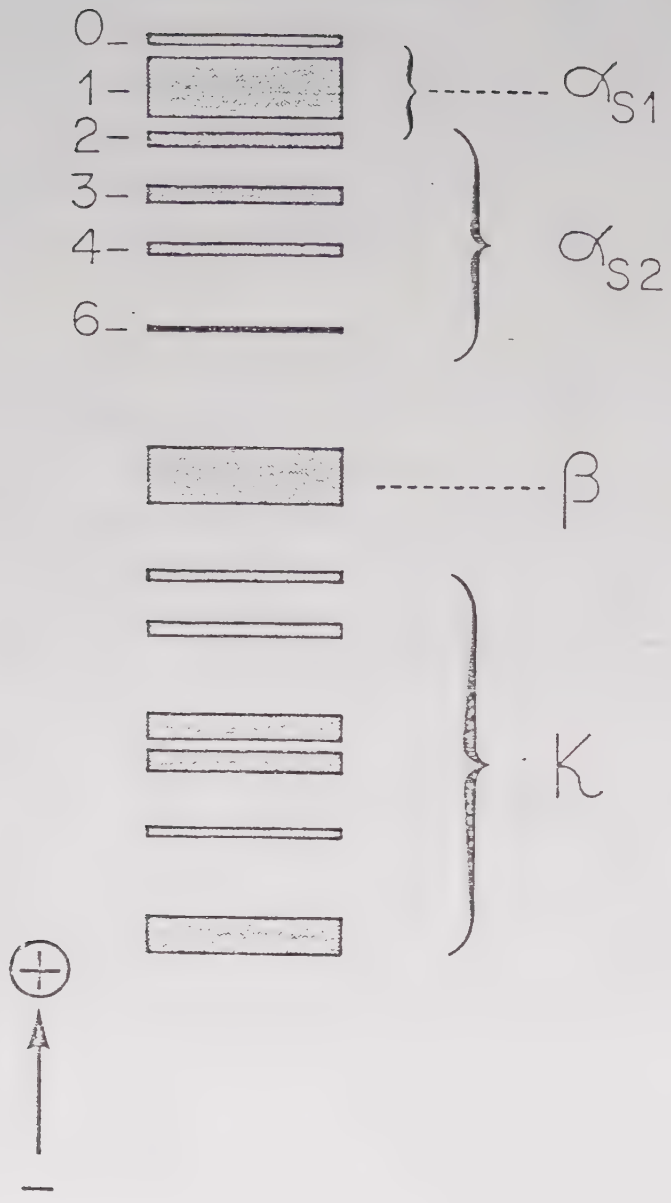


Figure 1. Représentation schématique du diagramme d'électrophorèse d'un échantillon de"caséine entière", en gel d'amidon avec urée et β-mercaptoéthanol à pH 8,6.

Compte-tenu des teneurs en glucides des 7 fractions qui croissent de la première (κ_1) à la septième (κ_7), et du fait désormais bien établi que seule la N-acétylgalactosamine est impliquée dans la liaison protéine-glycane de la caséine κ, l''hypothèse de FOURNET et al., sur la structure de la copule glucidique fixée au résidu 133, semble peu acceptable.

Récemment, KANAMORI et al. (1980) ont hydrolysé la bande κ_6 bovine par le bromure de cyanogène et des protéases (pronase et thermolysine) et isolé un glycopeptide comportant 3 chaînes saccharidiques fixées sur les résidus Thr 131, Thr 133, et Thr 135 ou 136 du caséinomacropeptide.

Par ailleurs ZEVACO, du Laboratoire de RIBADEAU-DUMAS à JOUY-en-JOSAS, a isolé, dans la bande κ_5, 2 autres glycopeptides correspondant aux segments Ile 152 ____ Thr 161 et Val 139 _____ Thr 145 (Résultats non publiés).

3. Interprétation de l'hétérogénéité observée en électrophorèse.

3-1. Fractions principales.

Apparemment, la caséine β est la seule des 4 caséines de vache qui ne présente pas d'hétérogénéité après électrophorèse en gel d'amidon avec urée et β-mercaptoéthanol (pH 8,6). Par contre, les 3 autres caséines sont hétérogènes :

a. La caséine κ existe sous forme de 7 bandes dont la moins mobile, à pH alcalin, κ_1,n'est pas glycosylée (Mc KINLAY et WAKE, 1965 ; PUJOLLE et al., 1966). La différence de mobilité entre les bandes κ_2 à κ_7 serait due à des quantités croissantes d'acide N-acétylneuraminique (SCHMIDT et al., 1966 ; VREEMAN et al., 1977 ; DOI et al., 1979).

La caséine κ contient un résidu phosphoséryle par mole (JOLLES et al., 1961), situé dans la caséinomacropeptide (MERCIER et al., 1972). Seule la fraction κ_4 contient un groupement phosphate supplémentaire localisé également dans le caséinomacropeptide (VREEMAN et al., 1977).

b. Les 4 fractions électrophorétiques constituant la caséine α_{s2} (bandes α_{s2}, α_{s3}, α_{s4}, α_{s6} selon la nomenclature d'ANNAN et MANSON, 1969) ne diffèrent que par leur teneur en groupements phosphate : 13, 12, 11, 10 respectivement, selon BRIGNON et al. (1976).*

c. A l'avant de la bande principale que constitue la caséine α_{s1}, existe à pH alcalin, une bande de moindre intensité (α_{s0}, dans la nomenclature d'ANNAN et al., 1969) qui représente en quantité environ 3 à 4 %

---

* L'expression : "caséine α_{s2}", devant désigner l'ensemble des bandes α_{s2}, α_{s3}, α_{s4} et α_{s6}.

. . . / . . .

de la caséine totale (MANSON et al., 1976). Par rapport à la fraction principale α_{s1}, la fraction α_{s0}, contient un groupement phosphate supplémentaire (MANSON et al., 1977).

Il existerait aussi, au niveau de la bande α_{s2}, une fraction plus lente que la fraction α_{s1} et comportant probablement un groupement phosphate en moins (7 au lieu de 8) (BRIGNON ,1979 ; GROSCLAUDE et al., 1978) (Figure 1).

A noter que dans certaines conditions d'électrophorèse classiques (WAKE et BALDWIN, pH 8,6), la bande de niveau α_{s2}, correspondrait donc à la superposition d'une fraction rapide de caséine α_{s2} et d'une fraction lente de caséine α_{s1}.

3.2. Fractions dites "mineures".

Elles résultent d'une protéolyse spécifique de la caséine β par une endopeptidase : la plasmine (EIGEL, 1977) et ne représentent en quelque sorte que des artéfacts. GROVES et al. (1972) et GORDON et al. (1972) ont en effet identifié les fragments γ TS, R, S, à des segments C-terminaux de la caséine β . On parle maintentant de caséines γ 1, γ 2, γ 3, selon la nomenclature de WHITNEY (1976). En 1978, ANDREWS a isolé les parties N-terminales issues de cette hydrolyse appelées "protéoses-peptones".

Toutes ces fractions ne sont pas décelables en électrophorèse en gel d'amidon avec urée et β-mercaptoéthanol à la concentration de 2,4 % utilisée habituellement pour étudier la caséine entière. Elles ont perdu une grande partie de leur intérêt depuis qu'elles ont été identifiées comme simples fragments de la caséine β .

4.Code de phosphorylation.

L'abondance dans le lait de la "caséine entière" ainsi que sa facilité de préparation ont conduit les premiers chercheurs à utiliser ce mélange de protéines comme matériel de base pour l'étude des phosphoprotéines.

Dans la glande mammaire, les chaînes polypeptidiques des caséines, sont synthétisées par les ribosomes du réticulum endoplasmique rugueux (GAYE et al., 1975).

TURKINGTON et TOPPER (1966) ainsi que SINGH et al.(1967) ont suggéré, à la suite d'études cinétiques, que la phosphorylation des caséines avait lieu après la formation des chaînes polypeptidiques (phosphorylation post-traductionnelle). Ultérieurement, des expériences de synthèse de caséines réalisées dans un milieu acellulaire contenant des membranes microsomales mammaires et de la sérine marquée, ont montré que l'incorporation du phosphate avait lieu au niveau de l'appareil de GOLGI (MERCIER et GAYE, 1980). Cet organite qui serait

.../...

le principal site d'incorporation des groupements phosphate dans les caséines serait par ailleurs riche en phosphorylkinases (BINGHAM et al., 1974, 1977 ; Mac KINLAY et al,1977), alors qu'il n'y a pas de phosphorylkinases au niveau des membranes du réticulum endoplasmique rugueux.

En définitive, tous les résultats expérimentaux actuels concordent avec l'hypothèse d'un processus de phosphorylation post-traductionnel, qui surviendrait dès le transfert des chaînes polypeptidiques vers le corps de GOLGI.

Depuis la mise en évidence dans les caséines de la phosphosérine par LIPMANN en 1933, et de la phosphothréonine par VERDIER en 1953, une série de phosphopeptides ont été isolés et analysés (OSTERBERG, 1966). Les observations faites sur ces peptides ont conduit OSTERBERG (1966) à suggérer que le mécanisme de phosphorylation faisait intervenir une charge négative située non loin du site de phosphorylation.

L'établissement de la structure primaire de la caséine α_{s1} bovine et la localisation de ses 8 groupements phosphate par MERCIER et al. (1971) ont conduit ces auteurs à reprendre et préciser l'hypothèse d'OSTERBERG : la phosphorylation serait bien dépendante de la structure primaire de la protéine et s'effectuerait au niveau des sites présentant les éléments de séquence suivants, aussi appelés "séquence code" :

Ser		Glu
ou	- X -	ou
Thr		SerP

Dans cet élément de séquence, X représente un acide aminé quelconque. Selon cette interprétation, la phosphorylkinase catalyserait l'estérification d'un résidu séryle ou thréonyle en position n à condition qu'il existe en position n + 2 un résidu à charge négative.

Par suite, grâce aux observations faites sur la structure primaire des 3 autres caséines bovines, MERCIER (1981) a présenté une analyse plus détaillée du problème. Selon ces auteurs, il convient de distinguer :

a. Les sites primaires de phosphorylation répondant à la séquence code suivante :

Ser		Glu
ou	- X -	ou
Thr		Asp

.../...

Exemples :

$$\text{dans la caséine } \alpha_{s1} : \text{SerP}^{75} - \text{Val} - \text{Glu}$$

$$\text{" " } \alpha_{s1}D : \text{ThrP}^{53} - \text{Met} - \text{Glu}$$

$$\text{" " } \alpha_{s0} : \text{SerP}^{41} - \text{Lys} - \text{Asp}$$

Dans les caséines α_{s1}, α_{s2}, β et κ, on compte respectivement 7, 15, 4 et 4 sites primaires de phosphorylation. L'examen de ces sites primaires indique que le résidu aspartyle n'est pas un déterminant aussi "efficace" que le résidu glutamyle. En effet, sur les 5 sites qui comportent un résidu aspartyle en position n + 2, un seul comporte une sérine phosphorylée : encore s'agit-il d'une phosphorylation ne portant que sur une faible fraction (3 à 4 %) des chaînes polypeptidiques (résidu Ser 41 de la bande α_{s0} de la caséine α_{s1}).

De même le résidu séryle serait un meilleur accepteur du groupement phosphate que le résidu thréonyle. Sur les 10 sites contenant des résidus thréonyle un seul est complètement phosphorylé (cas du résidu Thr 53 dans $\alpha_{s1}D$).

On peut donc écrire en termes de "potentialité de phosphorylation décroissante", la relation :

$$\text{Ser-X-Glu-} > \text{Thr-X-Glu} > \text{Ser-X-Asp} > \text{Thr-X-Asp}$$

b. Les sites secondaires de phosphorylation répondent à la séquence code :

$$\begin{matrix} \text{Thr} \\ \text{ou} \\ \text{Ser} \end{matrix} \quad - \text{X} - \quad \begin{matrix} \text{SerP} \\ \text{ou} \\ \text{ThrP} \end{matrix}$$

On compte 8 de ces sites dans les caséines α_{s1}, α_{s2} et β, qui sont complètement phosphorylés.

Cependant, on ne dispose actuellement d'aucun exemple prouvant sans ambiguité que les résidus SerP ou ThrP jouent le rôle de déterminant. On est cependant en droit de le supposer par analogie avec le site primaire. Une preuve indirecte en est par ailleurs donnée par la caséine β humaine qui comporte de 0 à 5 groupements phosphate/mole (GREENBERG et GROVES, 1976) : en effet sur 4 des 5 bandes portant des groupements phosphate, "la cinétique" de phosphorylation

. . . . . .

indique que 2 sites primaires (Ser-x-Glu) sont d'abord phosphorylés (bandes 1 et 2). Ensuite la phosphorylkinase reconnaitrait la SerP comme déterminant secondaire dans la phosphorylation des bandes 4 et 5.

En conclusion, on peut admettre actuellement que ces séquences code tripeptidiques constituent une condition nécessaire, mais non suffisante, pour que se produise l'incorporation des groupements phosphate dans les caséines. Il est certain que d'autres facteurs interviennent : on peut penser à la charge électrique, l'hydrophobicité, la structure secondaire et l'encombrement stérique, la concentration en caséine kinase (s) etc. (MERCIER, 1981).

Nous verrons, au paragraphe III, que l'analyse des altérations caractérisant certains variants électrophorétiques des caséines a apporté des éléments de confirmation aux hypothèses de MERCIER (1981) sur le code de phosphorylation des caséines.

B.PROTEINES DU LACTOSERUM.

1.Protéines principales : α -lactalbumine, β -lactoglobuline.

Les deux principales protéines du lactosérum sont la β -lactoglobuline (3 g/l) et l' α -lactalbumine (0,7 g/l) toutes deux synthétisées dans la glande mammaire.

L' α -lactalbumine qui est l'une des 2 sous-unités de la lactose synthétase joue un rôle biologique important en contrôlant la synthèse du lactose durant la lactation (EBNER,et al., 1974).

Le rôle de la β-lactoglobuline est encore totalement inconnu. Elle n'existerait pas chez la femme, le cobaye, la chamelle et elle n'est pas propre ruminants car elle a été isolée chez la truie (KESSLER et BREW, 1970), chez la jument (JENNESS, 1978) et l'ânesse (ADDEO, 1978).

Ce sont des protéines globulaires. Leur structure primaire a été élucidée par BRAUNITZER et al.(1972) pour la β-lactoglobuline et par BREW et al. (1970) pour l' α-lactalbumine. Elles sont dépourvues de groupements phosphates bien qu'elles possèdent 2 à 3 sites potentiels de phosphorylation par chaîne ; une fraction de l' α-lactalbumine est glycosylée.

..../...

2. Autres protéines.

Une partie des autres protéines est également synthétisée dans les cellules de la glande mammaire. On citera par exemple

- la lactoferrine étudiée par GROVES (1960) sous le nom de "protéine rouge", et homologue de la transferrine sérique.

- la lactolline ou β-2-microglobuline (GROVES et GREENBERG, 1977) qui n'est autre que la chaîne légère des antigènes contrôlés par le système d'histocompatibilité majeur : (BoLA).

D'autres lactoprotéines proviennent du plasma sanguin telles que la sérum albumine (0,3 g/l), la transferrine (2 g/l),les immunoglobulines, IgG, IgM, etc...

Le lactosérum contient en outre toute une série d'enzymes : lysosyme, nucléases, phosphates, lypases, amylases, lactoperoxydase, catalase, aldolase, etc... (McKENZIE, 1971).

III. POLYMORPHISME GENETIQUE DES LACTOPROTEINES DES BOVINES.

1. Principes.

L'ADN chromosomique n'est pas totalement stable. Il est soumis à des remaniements divers, ou mutations, dont le plus simple est la substitution d'une base par une autre ; ces remaniements peuvent aussi être plus importants (délétions, insertions, inversions, ...). Au cours de l'évolution, certaines de ces mutations ont été maintenues à des fréquences diverses dans les populations.

Jusqu'à présent les techniques biochimiques disponibles se prêtaient mal à l'analyse directe du polymorphisme des ADN géniques. Par contre, la mise en oeuvre de la technique d'électrophorèse en gel (amidon, acrylamide) a permis d'analyser d'une manière assez fine, le polymorphisme génétique au niveau des produits des gènes, les protéines. On parle ainsi de "polymorphisme électrophorétique", les diverses formes d'une même protéine étant appelées "variants électrophorétiques", ou par certains auteurs "électromorphes".

La technique d'électrophorèse sépare les protéines en fonction, essentiellement, de leur charge et leur masse moléculaire. Elle ne permet donc pas, en principe de distinguer deux variants génétiques d'une même protéine s'ils ne diffèrent que par la substitution d'un acide aminé neutre. On peut calculer (McCLUER, 1965) qu'en général la technique d'électrophorèse conduit à mettre en évidence le tiers seulement de la variation réellement existante. Cette estimation est également valable pour les caséines (GROSCLAUDE et al., 1972 a). Les

. . . / . . .

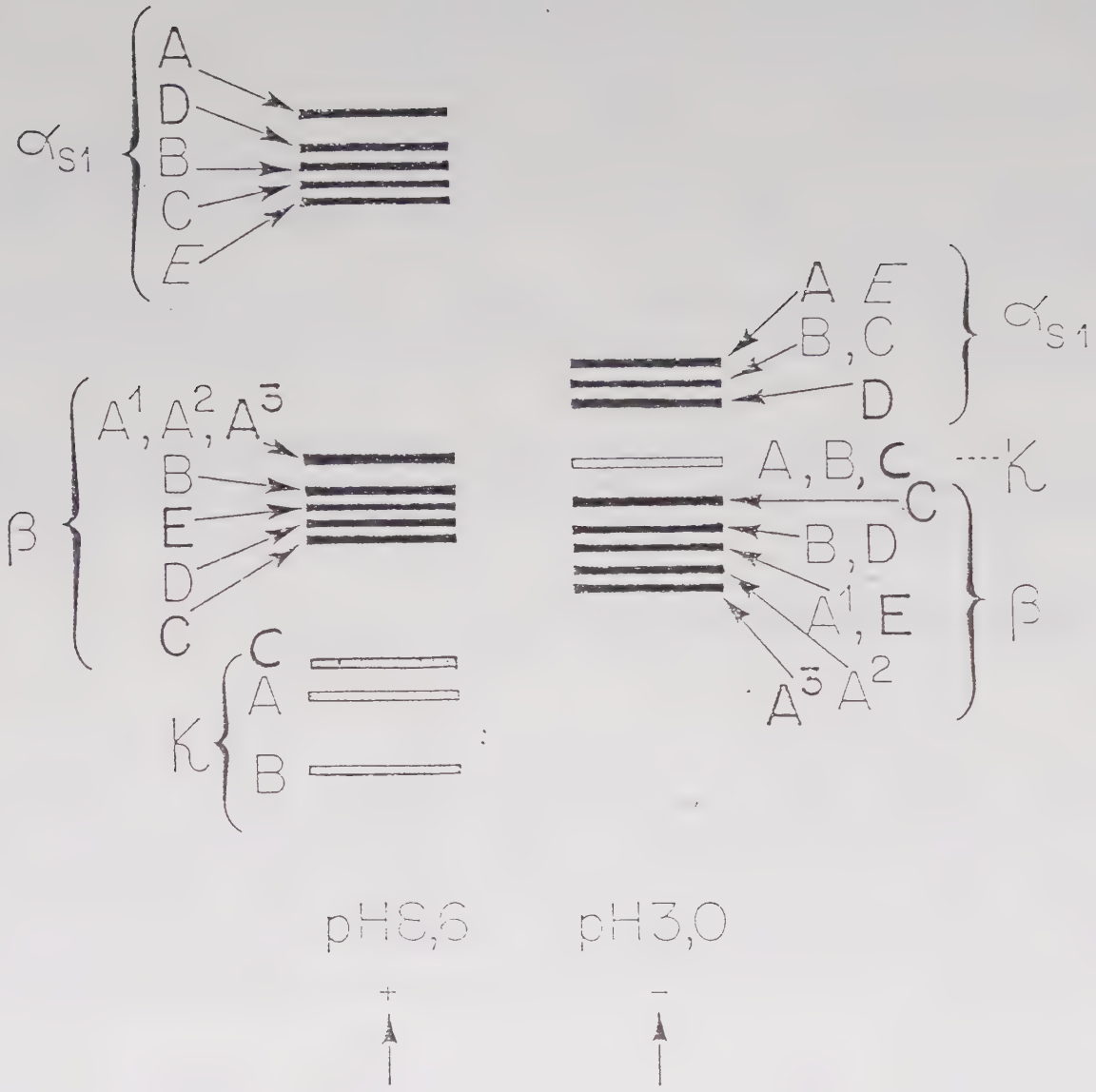


Figure 2. Mobilités relatives des variants électrophorétiques des caséines α_{s1}, β et κ bovines en électrophorèse en gel d'amidon avec urée et β-mercaptoéthanol (pH 8,6 et pH 3,0).

(D'après GROSCLAUDE, 1973 b avec adjonction du variant κ-CnC).

diverses formes électrophorétiques d'une protéine peuvent donc correspondre soit à un seul variant génétique, soit à un groupe de variants indiscernables dans les conditions utilisées.

Notons enfin que la zone de pH dans laquelle peuvent être distingués certains variants dépend de la substitution d'acides aminés par laquelle ils diffèrent. Ceci conduit à mettre en oeuvre parallèlement, et en particulier dans le cas des lactoprotéines, des électrophorèses à pH alcalin et des électrophorèses à pH acide.

2. Inventaire des variants électrophorétiques des lactoprotéines.

2-1. Mise en évidence du polymorphisme.

L'analyse du polymorphisme électrophorétique des 6 lactoprotéines principales (caséines α_{s1}, α_{s2}, β et κ, α-lactalbumine, β-lactoglobuline) a surtout été effectuée de manière approfondie dans de nombreuses races bovines occidentales (Bos taurus), mais elle a aussi été étendue à d'autres populations, y compris chez le zébu (Bos indicus), et le yak (Bos grunniens).

Le premier polymorphisme qui ait été décrit est celui de la β-lactoglobuline (variants A et B), mis en évidence par ASCHAFFENBURG et DREWRY (1955, 1957) qui utilisaient d'ailleurs, à l'époque, l'électrophorèse sur papier. Le dernier en date, celui de la caséine α_{s2}, a été mis en évidence par GROSCLAUDE et al.(1976).

La plupart des variants connus à ce jour ont été identifiés par électrophorèse en gel d'amidon ou en gel d'acrylamide avec urée et β-mercaptoéthanol. Les conditions couramment utilisées dans notre équipe ont été, pour le gel d'amidon à pH alcalin (8,6) celles de WAKE et BALDWIN (1961), pour le gel d'amidon à pH acide (3,0) celles de PETERSON et KOPFLER (1966), et pour le gel d'acrylamide à pH 9,2, celles de PETERSON (1963). De manière générale, le gel d'amidon s'est révélé être un meilleur support d'analyse pour les caséines κ et α_{s2}, le gel d'acrylamide pour la caséine α_{s1}.

2-1.1. Caséines.

La figure 2 indique de manière schématique la mobilité relative des variants électrophorétiques des caséines α_{s1}, β et κ, à l'exception de 3 variants très rares et encore mal décrits. Les figures 3 à 5 représentent de manière plus complète les variants de la caséine α_{s2}, puisque l'étude de deux d'entre eux fera l'objet de la présente Thèse.

. . . . . .

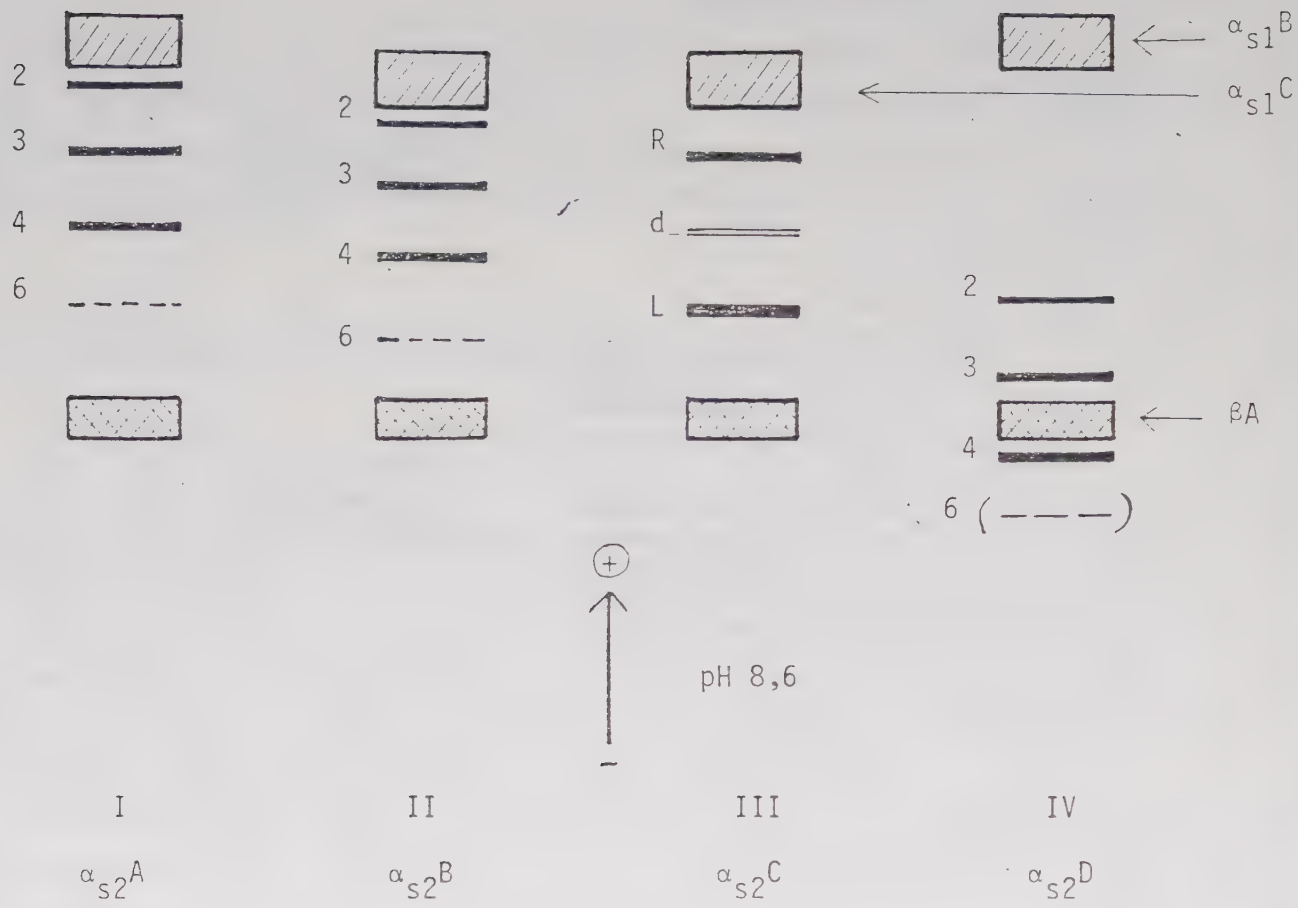


Figure 3. Représentation schématique des variants électrophorétiques de la caséine α_{s2} dans le genre Bos.

Electrophorèse en gel d'amidon avec urée et β-mercaptoéthanol (pH 8,6)
Les variants α_{s2}^A, α_{s2}^B, α_{s2}^D comportent 4 bandes numérotées 2, 3, 4 et 6 selon la nomenclature d'ANNAN et MANSON (1969). La bande 6 du variant α_{s2}^D est représentée entre parenthèse car migrant dans la zone de bandes de caséine κ, elle n'a pas, en fait, été identifiée au cours de cette étude.
Le variant α_{s2}^C comporte 2 bandes principales, L et R, et un doublet, A noter que les variants α_{s2}^B et α_{s2}^C sont toujours associés au variar α_{s1}^C .

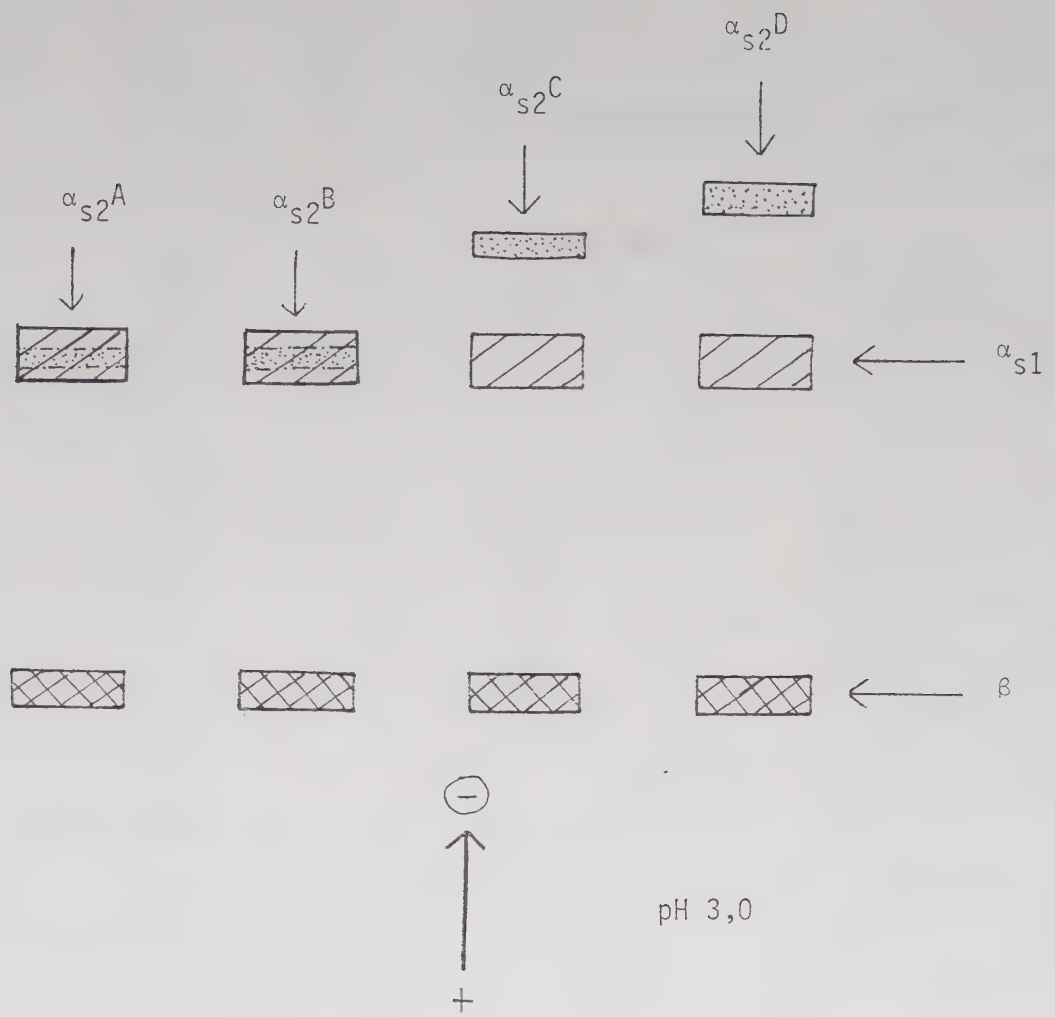
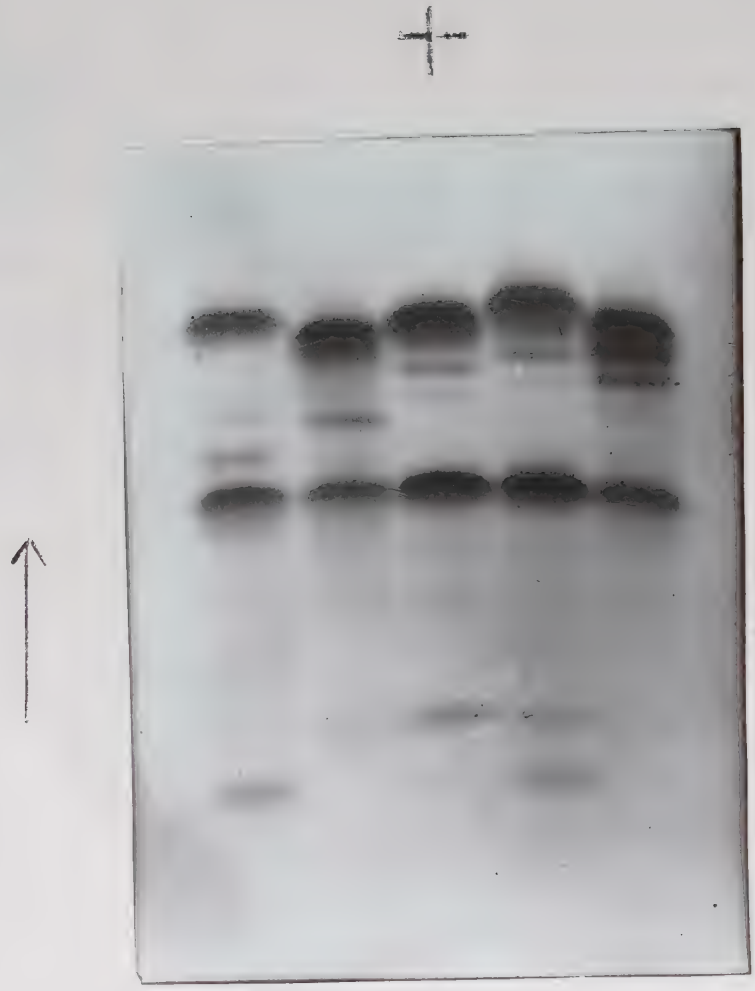


Figure 4. Représentation schématique des variants électrophorétiques de la caséine α_{s2} dans le genre Bos. Electrophorèse en gel d'amidon avec urée et β-mercaptoéthanol (pH 3,0).

caséine α_{s2}

Les variants α_{s2}^A, α_{s2}^B migrent au niveau de la caséine α_{s1}.



I II III IV V

Figure 5. Electrophorèse en gel d'amidon avec urée et β -mercaptoéthanol (pH 8,6), d'échantillons individuels de caséine bovine montrant les principaux variants de caséine α_{s2}: I : α_{s2}D ; II : α_{s2}C ; III : α_{s2}B ; IV : α_{s2}A (bovin) ; V : α_{s2}A (yak).

Ces figures font apparaître les caractéristiques suivantes :

Caséine α_{s1} : les 5 variants sont tous séparés à pH alcalin.

Caséine α_{s2} : les 4 variants sont également tous séparés à pH alcalin.

Caséine β : la mise en oeuvre parallèle d'électrophorèses à pH alcalin et à pH acide est ici nécessaire pour distinguer les 7 variants actuellement connus. Un bel exemple est celui des variants A^1, A^2 et A^3 qui, avant introduction de l'électrophorèse en gel acide (PETERSON et KOPFLER, 1966) étaient confondus sous la forme d'un variant A.

Outre les variants schématisés dans la figure 2, on trouvera mention,dans la littérature, d'autres subdivisions : THOMPSON et al. (1969) ont signalé que le variant B donnait des "fingerprints" différents chez les bovins et les zébus. Toutefois, GROSCLAUDE et al. (1974 a) ont vérifié que la substitution responsable de la différence de charge entre le variant B et le variant A^1 était la même dans les deux espèces. Les différences suggérées par les analyses de THOMPSON et al. (1969) correspondent donc à des substitutions d'acides aminés neutres dont la détection systématique est actuellement impossible.

CREAMER et RICHARDSON (1975),en Nouvelle-Zélande, ont trouvé chez 2 vaches un variant, migrant comme A^1 à pH acide et comme B à pH alcalin, qu'ils ont appelé B^2. ABE et al. (1975), au Japon, ont décrit un variant rare, A', migrant très lentement à pH acide, et très près de A à pH alcalin. Des essais ont été effectués dans notre Laboratoire pour tenter de purifier ce variant Enfin, GROSCLAUDE (1975) a montré qu'un variant, identique au variant A^3,trouvé dans la race bovine Mongole, différait du variant A^2 par une substitution différente de celle spécifique du variant A^3 européen, et devait donc être considéré comme un variant différent.

Caséine κ : les trois variants se séparent à pH alcalin.

2-1.2. Protéines du lactosérum.

α-lactalbumine : les deux variants s'observent à pH acide, comme à pH alcalin.

β-lactoglobuline : [illegible] à pH acide.

Les variants D et D_{vak}, de même comportement électrophorétique dérivent en

.../...

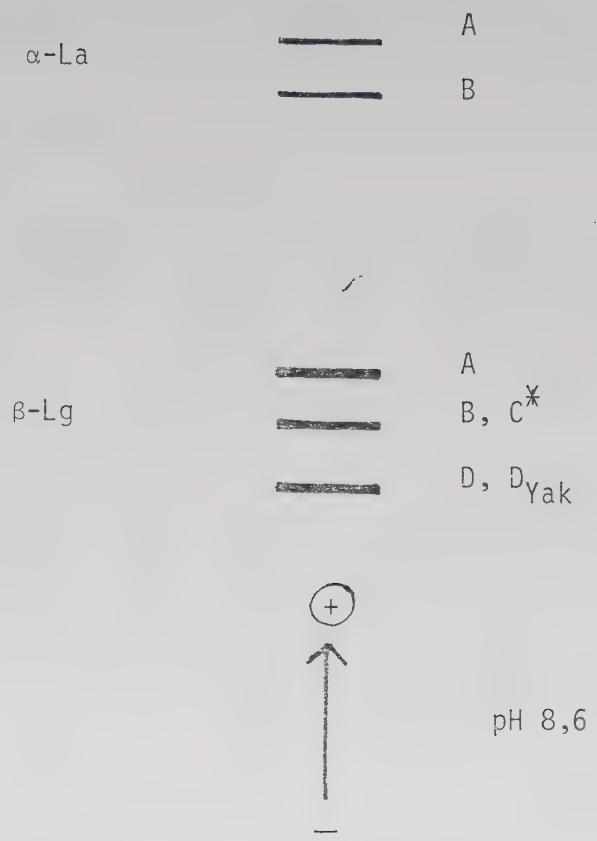


Figure 6. Mobilité relative en gel d'amidon avec urée et β-mercaptoéthanol (pH 8,6) des variants électrophorétiques de l'α-lactalbumine et de la β-lactoglobuline mis en évidence dans le genre Bos.

* Les variants β-Lg B et C se séparent en gel de polyacrylamide 5 % en tampon phosphate pH 6,8 (GROSCLAUDE et al., 1966) ou à pH acide.

Loci	Variants observés chez : le boeuf Bos taurus	le Zébu Bos indicus	le Yak Bos Grunniens
α_{s1}-Cn	A, B, C, D	B, C	C, E
α_{s2}-Cn	A, D	A, B	A, C
β-Cn	A^1, A^2, A^3, B, C, E $A^3_{Mongolie}, B^2, A'$	A^1, A^2, B, D $(B_z)^*$	A^2
κ-Cn	A, B, C	A, B	A, B
α-La	B	A, B	B
β-Lg	A, B, C, D	A, B	D_{Yak}

Tableau 2. Répartition des variants des 6 lactoprotéines dans les 3 espèces du genre Bos : boeuf, zébu, yak.

* La différence existant entre les variants B et B_z n'est pas encore bien établie (GROSCLAUDE, 1979).

fait de mutations différentes (GROSCLAUDE et al.,1976 a). Rappelons que le polymorphisme de la β-lactoglobuline (variants A et B) est le premier qui ait été décrit pour les lactoprotéines (ASCHAFFENBURG et DREWRY, 1955 , 1957).(Figure 6).

2-2. CASEINES.

Le tableau 2 qui récapitule nos résultats actuels sur la répartition des divers variants des caséines dans les populations étudiées, appelle les commentaires suivants :

- Locus α_{S1}-Cn : le variant C est le seul qui soit commun aux 3 espèces du genre Bos. Ce résultat a une valeur générale. Par ailleurs, ce locus se caractérise par une situation originale : sauf dans la race de Jersey de l'île de Jersey (LARSEN et al., 1974) la fréquence du variant B est supérieure à 0,5, donc à celle du variant C dans toutes les races taurines; à l'inverse, dans les races de zébu, le variant C prédomine nettement. Le variant A, très localisé , est sans doute d'apparition assez récente.(Tableau 3).

- locus α_{S2}-Cn : Ce locus a longtemps été considéré comme monomorphe jusqu'à la découverte, par notre équipe, d'un polymorphisme chez des yaks et zébus népalais (GROSCLAUDE et al., 1976 a),puis dans deux races de l'Est de la France, notamment dans une race de très faibles effectifs, la Vosgienne (GROSCLAUDE et al., 1979). (Tableau 4).

- locus β-Cn : Le variant A^2 a été trouvé dans toutes les races, et il est en général le plus fréquent, sauf dans un groupe de races du nord-ouest de l'Europe (Holstein, Ayrshire, Flamande, Maine-Anjou) ou A^1 prédomine et dans deux races de la Manche,Normande et Jersey (KIDDY et al, 1968 ; LI et GAUNT, 1972 ; GROSCLAUDE, 1974). Le variant C est assez ubiquitaire mais en général peu fréquent. Les autres variants sont plus rares et localisés dans certaines races ou groupes de races.

- locus κ-Cn : Le variant A prédomine. Le variant C n'a été découvert que récemment dans des races italiennes (DI STASIO et MERLIN, 1979).

2-3.Protéines du lactosérum.

Le tableau 5 récapitule nos résultats, non encore publiés.

.../..

Race	Année	Effectif	α_{s1}-Cn					β-Cn						κ-Cn	
			A	B	C	D	E	A^1	A^2	A^3	B	C	D	A	B
Flamande	1965	380	-	86,8	9,1	4,1	-		(93,6)		6,4	-		non analysé	
"	1971	298	-	80,0	12,2	7,8	-	40,6	53,4		6,0	-		85,6	14,4
F.F.P.N.	1965	366	-	98,9	1,1	-	-		(95,2)		4,8	-		non analysé	
Holstein	1967	281	0,2	97,3	2,5	-	-	52,7	45,2	1,4	0,5	-		70,9	29,1
Normande	1965-6	155	-	81,3	18,7	-	-	20,0	32,2	2,0	44,8	1,0		33,6	66,4
"	1972	318	-	82,0	18,0	-	-	19,0	29,3	3,6	47,2	0,9		33,7	66,3
Bretonne Pie-Noire	1966	93	-	84,4	15,6	-	-		(84,4)		6,5	9,1		57,5	42,5
Maine-Anjou	1973	39	-	96,2	3,8	-	-	60,3	35,8	-	2,6	1,3		71,8	28,2
Parthenaise	1966	85	-	70,6	28,8	0,6	-		(89,4)		9,4	1,2		50,6	49,4
Charolaise	1973	53	-	90,6	6,6	2,8	-	17,0	70,7	-	8,5	3,8		39,6	60,4
Limousine	1973	40	-	70,0	28,8	1,2	-	8,8	73,7	-	12,5	5,0		40,0	60,0
Bazadaise	1965	44	-	89,8	9,1	1,1	-		(96,6)		3,4	-		non analysé	
Blonde d' Aquitaine	1968	161	-	83,6	14,5	1,9	-	20,5	71,4	-	8,1	-		64,9	35,1
Tarentaise	1967	286	-	86,4	13,6	-	-	25,6	59,6	-	3,7	11,1		63,1	36,9
Abondance	1965	78	-	91,0	9,0	-	-		(91,0)	-	3,2	5,8		non analysé	
Montbéliarde	1975 1965	798	-	91,0	9,0	-	-	15,4	64,2	-	18,5	1,9		63,2	36,9
Vosgienne	1975	228	-	90,8	9,2	-	-	23,0	71,1	-	2,2	3,7		48,2	51,8
Tachetée de l'Est	1979	142	-	90,5	9,5	-	-	28,2	62,3	-	3,5	6,0		59,5	40,5
Brunes des Alpes	1979	155	-	91,9	6,1	1,9	-	32,8	45,9	-	18,8	2,5		51,7	48,3
Salers	1979	158	-	96,5	3,5	-	-	17,9	70,8	-	11,3	-		53,5	46,5
Ferrandaise	1979	81	-	90,7	9,3	-	-	21,6	72,2	-	2,5	3,7		72,2	27,8
Zébus Malgaches	1968	586	-	16,6	83,4	-	-	9,9	90,1	-		-		74,9	25,1
Yaks Népalais	1976	42	-	2,0	63,0	-	35,0	-	100	-	-	-		93,0	7,0
Yaks Mongols	1976	164	-	-	62,0	-	34,0	-	100	-	-	-		non analysé	

Tableau 3.

Race	Année	Effectif	α_{s2}-Cn			
			A	B	C	D
Montbéliarde	1975	790	98,9	-	-	1,1
Vosgienne	1976	228	91,2	-	-	8,8
Yaks Népalais	1976	42	77,4	-	22,6	-
Yaks Mongols	1976	164	80	9	11	-

Tableau 4. Fréquences des variants de caséines α_{s2} dans les races de populations où un polymorphisme a été observé.

Tableau 3. Fréquences des variants des caséines α_{s1}, β et κ dans les races françaises et dans des populations de zébus et de yaks.

Races	Année	Effectif	β-Lactoglobuline				α-Lactalbumine	
			A	B	D	D_{Yak}	A	B
Taurins (Bos taurus)								
Flamande	1965	402	42	58	-	-	-	100
F.F.P.N.	1965	397	56	44	-	-	-	100
Normande	1965	400	48	52	-	-	-	100
Montbéliarde	1965	400	76	23	1	-	-	100
Pie-Rouge de l'Est	1979	143	38	62	-	-	-	100
Vosgienne	1975	246	57	43	<1	-	1	99
Brunes des Alpes	1975	157	52	48	-	-	-	100
Tarentaise	1967	299	46	54	-	-	-	100
Ferrandaise	1979	61	60	40	-	-	-	100
Race Mongole	1975	292	11	89	-	-	-	100
Yaks (Bos grunniens)								
Mongolie	1976	328	1*	1*	-	98	-	100
Népal	1973	42	-	-	-	100	-	100
Zébus (Bos indicus)								
Madagascar	1968	778	27	73	-	-	17	83
Choa (Tchad)	1975	92	14	86	-	-	21	79

Tableau 5. Fréquences alléliques aux locus β-Lg et α-La dans quelques races de taurins (France et Mongolie), Yaks et Zébus (en %). Le polymorphisme de l' α-lactalbumine est caractéristique du zébu. Le yak possède un variant de β-lactoglobuline spécifique : * présence de β-LgA et B, à très faible fréquence due à peu près surement à quelques croisements avec les taurins locaux (Résultats non publiés).

- Locus β-Lg :Chez les bovins les fréquences des variants A et B, qui prédominent sont souvent assez équilibrées. Le variant D_{Yak} paraît fixé chez Bos Grunniens.

- Locus α -La : l'α-lactalbumine est monomorphe dans toutes les races bovines étudiées jusqu'ici à l'exception de la race Vosgienne, ainsi que chez le Yak. Le variant rare trouvé en race Vosgienne paraît différent du variant A trouvé chez le Zébu (GROSCLAUDE, MAHE, MERCIER, non publié). Ce dernier, qui a été trouvé dans toutes les populations de zébu étudiées jusqu'ici, paraît donc spécifique de Bos indicus.

3.Etroite liaison des locus de structure des 4 caséines bovines.

GROSCLAUDE et al. (1964, 1965, 1966), et,indépendamment KING et al. (1965) et LARSEN et THYMANN (1966) ont montré que dans la descendance de taureaux double-hétérozygotes pour deux au moins des trois locus de structure, α_{s1}-Cn, β-Cn, et κ-Cn, on n'observait la transmission que de deux combinaisons alléliques. Ces auteurs ont conclu à l'existence d'une liaison génétique très étroite entre ces 3 locus : dans les familles étudiées, les deux combinaisons alléliques transmises étaient interprétées comme étant les combinaisons parentales, et il n'y avait donc pas apparition de recombinants.

Cette étroite liaison génétique se traduit, au niveau des populations, par un "déséquilibre de linkage" très accusé entre les allèles des locus α_{s1}-Cn et β-Cn et un peu moins accusé entre les allèles de ces deux loci et ceux du locus κ-Cn (GROSCLAUDE et al., 1973, 1974 ; VOGLINO et CARIGNANO, 1975). Ce phénomène va jusqu'à l'absence, ou l'extrême rareté, dans la plupart des races françaises par exemple, de certaines combinaisons alléliques : c'est le cas - si on ne considère que les allèles les plus fréquents - des combinaisons α_{s1}-Cn^C β-Cn^{A1} et α_{s1}-Cn^C - β-Cn^B (GROSCLAUDE et al., 1966, 1973)(Tableau 6).

Les données obtenues chez le zébu (Bos indicus) et le yak (Bos poephagus) indiquent que, dans ces espèces, et comme on pouvait s'y attendre, les loci α_{s1}-Cn, β-Cn et κ-Cn sont également liés (GROSCLAUDE,et al., 1974,1976 b).

Pendant longtemps, faute d'avoir pu observer un polymorphisme au niveau de la caséine α_{s2}, aucune étude n'avait pu être effectuée sur le déterminisme génétique de cette caséine. Toutefois, l'analyse du polymorphisme observé chez des taurins, zébus et yaks népalais a permis à GROSCLAUDE et al.(1976 b) de conclure que le locus α_{s2}-Cn était vraisemblablement lié aux 3 autres locus. Cette conclusion devait être confirmée par une analyse génétique du polymorphisme observé

.../...

Combinaisons alléliques*	RACES (EFFECTIFS DES ECHANTILLONS)								
	Blonde d'Aquitaine (161)	Flamande (298)	Holstein (281)	Montbéliarde (350)	Normande 1966 (155)	Normande 1973 (318)	Tarentaise (286)	Brune des Alpes (149)	Tachetée de l'Est (132)
AA^1A	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-
BA^2A	45,5	30,6	37,1	31,3	11,6	13,6	30,4	17,7	31,4
BA^2B	9,5	3,6	7,2	23,9	3,9	1,3	15,6	21,7	22,4
BA^1A	3,0	39,3	31,1	10,3	16,5	13,8	18,2	21,4	15,8
BA^1B	17,5	1,3	21,4	5,1	3,5	5,2	7,4	11,0	11,9
BBA	5,6	5,2	-	15,4	1,6	1,9	2,9	8,7	2,8
BBB	2,5	-	0,5	3,1	43,2	45,3	0,8	9,7	0,7
BCA	-	-	-	0,5	-	-	11,1	-	1,3
BCB	-	-	-	1,4	1,0	0,9	-	2,4	4,4
CA^1A	-	-	-	-	-	-	-	-	1,7
CA^2A	8,9	5,1	1,1	5,7	1,9	0,8	0,5	3,1	6,8
CA^2B	5,6	7,1	-	3,3	14,8	13,6	13,1	2,1	0,8
CA^3A	-	-	1,4	-	2,0	3,6	-	-	-
CBA	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-
CBB	-	-	-	**	-	-	-	0,4	-
CCA	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-
DA^2A	1,9	4,6	-	-	-	-	-	-	-
DA^2B	-	2,4	-	-	-	-	-	1,4	-
DBA** ou DA^1A	-	0,8	-	-	-	-	-	-	-

TABLEAU 6 : Fréquence des combinaisons alléliques de l'unité génétique formée par les loci α_{s1}-Cn, β-Cn, et κ-Cn.

* pour AA^1A, lire α_{s1}-Cn^A - β-Cn^{A^1} - κ-Cn^A, etc....

** combinaison rare, trouvée chez deux vaches ne faisant pas partie de cet échantillon.

*** observée chez une seule vache, et non identifiée avec certitude.

Linkage examiné	Auteurs	Nombre de couples mère - fille utiles
α_{s1}-Cn and β-Cn	Grosclaude et al.,1964	78
	Larsen and Thymann,1966	45
	Grosclaude (non publié)	25
	Total	148
α_{s1}-Cn or β-Cn and κ-Cn	Grosclaude et al., 1965	108
	Larsen and Thymann, 1966	143
	Total	251
α_{s1}-Cn, β-Cn, κ-Cn and α_{s2}-Cn	Grosclaude et al., 1978	49

Tableau 7 . Nombre de couples mère-fille ayant servi à l'analyse du linkage entre les loci α_{s1}-Cn, β-Cn, κ-Cn, α_{s2}-Cn. Aucun recombinant n'a été observé ce qui démontre la liaison étroite existant entre ces loci. (GROSCLAUDE, 1979).

peu de temps après dans les races Vosgienne et Montbéliarde. Dans cette analyse également, aucun recombinant n'était observé entre les allèles du locus α_{s2}-Cn et les allèles des locus des autres caséines. Ce résultat confirmait l'étroite liaison du locus α_{s2}-Cn avec les locus α_{s1}-Cn , β-Cn et κ-Cn (GROSCLAUDE et al., 1978).

Le tableau 7 récapitule l'ensemble des données d'analyse de ségrégation relatives aux locus de structure des caséines qui ont été publiées jusqu'ici.Ce tableau ne prend en compte que les résultats fiables. En effet, les données de HINES et al. (1968) et MACHA et MULLEROVA (1968, 1969) ont visiblement été obtenues sur du matériel comportant des erreurs d'identification des filiations.

4. Analyse biochimique des variants électrophorétiques des caséines α_{s1}, β et κ, de l'α-lactalbumine et de la β-lactoglobuline.

Toutes les altérations biochimiques spécifiques des variants des caséines α_{s1}, β et κ, de l' α-lactalbumine et de la β-lactoglobuline ont été identifiées et localisées dans les chaînes polypeptidiques, par référence aux séquences d'acides aminés établies par MERCIER et al.(1971) pour la caséine α_{s1},RIBADEAU-DUMAS et al. (1972) pour la caséine β , MERCIER et al. (1973) pour la caséine κ , BREW et al. (1970) pour l' α-lactalbumine, et BRAUNITZER et al. (1972) pour la β-lactoglobuline.

Ces travaux biochimiques sur les variants des lactoprotéines sont dus à GROSCLAUDE et al. (1972 a, 1972 b, 1974 a, 1974 b, 1976 a), RIBADEAU-DUMAS et al. (1970) pour les caséines, à BELL et al. (1970) pour l' α-lactalbumine, et à BELL et al. (1968), BRAUNITZER et al. (1972) ,BRIGNON et al.,(1973) et GROSCLAUDE et al.,(1976 a) pour la β-lactoglobuline.

L'examen de l'ensemble de ces résultats (Figure 7) conduit à quelques observations :

- la différence de mobilité électrophorétique entre deux variants est due, en général, à la substitution d'un seul acide aminé.Toutefois, l'exemple d'une délétion assez importante a été mis en évidence (variant α_{s1}-CnA).

- Les substitutions d'acides aminés responsables des différences de mobilité électrophorétique entre les variants de caséine les plus fréquents (α_{s1}B et α_{s1}C, βA^1 et βA^2, κA et κB) sont identiques chez les taurins (Bos taurus) et chez les zébus (Bos indicus). Les mutations correspondantes sont donc survenues à une date reculée, antérieure à la séparation des deux espèces.

.../...

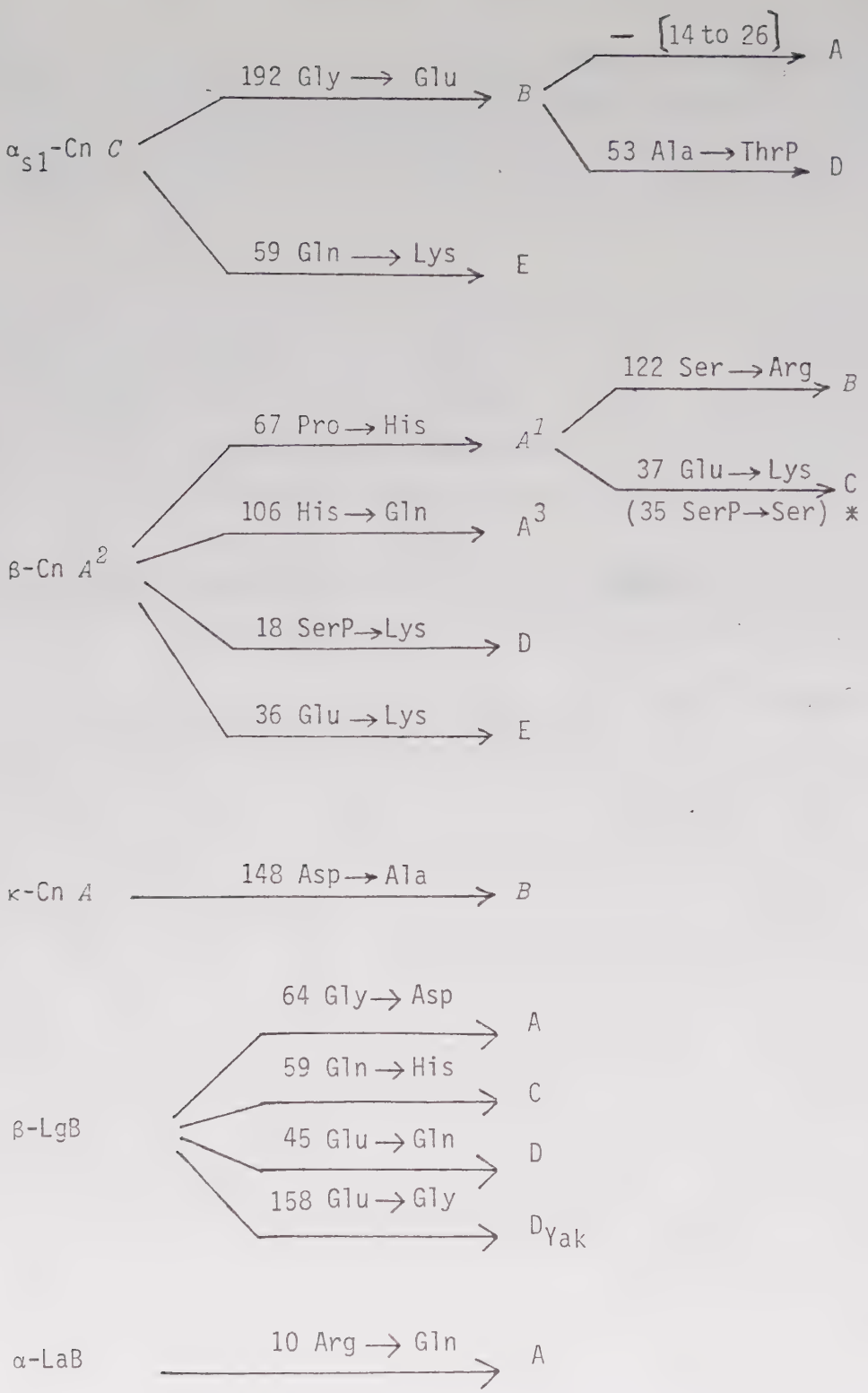


Figure 7. Relations existant entre les variants des caséines α_{s1}, β, κ et ceux des protéines du lactosérum ; β-Lg et α-La . Les variants α_{s1}C, βA^2, κA, β-LgB, α-LaB sont considérés comme variant d'origine. Figurent également sur ce tableau, les altérations responsables de la différence de mobilité électrophorétique existant entre ces variants (D'après GROSCLAUDE, 1979).

- Par contre, certains autres variants électrophorétiques recouvrent des mutants différents : c'est le cas du variant D de la β-lactoglobuline bovine, qui est différent en fait du variant de même mobilité observé chez le yak (GROSCLAUDE et al., 1976 a) ; c'est le cas également des variants bovins β-CnA^3 et β-CnA$^3_{Mongolie}$ (GROSCLAUDE, 1975) ; c'est vraisemblablement le cas, enfin, des variants α-LaA du zébu et du variant rare, de même mobilité, trouvé en race Vosgienne (GROSCLAUDE et MAHE, non publié).

4-1. Phylogénie des variants électrophorétiques.

La connaissance des altérations spécifiques de chaque variant et les estimations de fréquence faites dans de nombreuses populations, permettent de faire des hypothèses assez plausibles sur la phylogénie des variants (Figure 7) et même dans le cas des caséines, sur celle des combinaisons alléliques (Figure 8) (GROSCLAUDE et al., 1973).

La seule vraie difficulté d'interprétation des résultats génétiques réside dans l'identification du variant de référence, ou variant "originel" de la caséine α_{s1}. En effet, si le variant α_{s1}-CnB est de loin le plus fréquent chez Bos taurus , par contre α_{s1}-CnC est plus fréquent chez Bos indicus. GROSCLAUDE et al. (1966) qui avaient d'abord travaillé sur les bovins, avaient suggéré que le variant α_{s1}-CnB était le variant originel. Toutefois, le fait que ce variant soit absent chez le yak, où α_{s1}-CnC prédomine comme chez le zébu, a conduit ces auteurs à conclure, en définitive, que le variant de référence devait être α_{s1}-CnC (GROSCLAUDE, 1979).

4-2. Variants électrophorétiques et code de phosphorylation des caséines.

Les observations biochimiques faites sur certains variants électrophorétiques des caséines ont apporté des éléments utiles à l'analyse du code de phosphorylation de ces protéines.

- Dans le variant α_{s1}D, il y a apparition d'une thréonine en position n, par rapport à un acide glutamique en position n + 2. Or,La thréonine est phosphorylée, conformément à la règle proposée (MERCIER et al., 1971).

../...

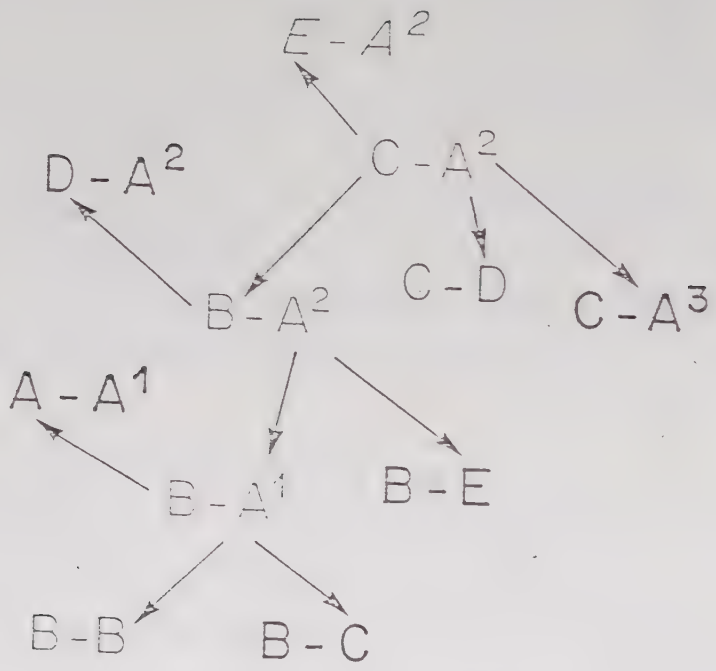
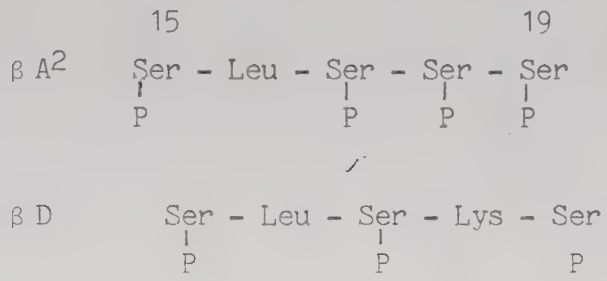


Figure 8. Phylogénie des combinaisons alléliques du couple α_{s1}-Cn-β-Cn chez les bovins et les zébus, à l'exclusion des combinaisons recombinantes.

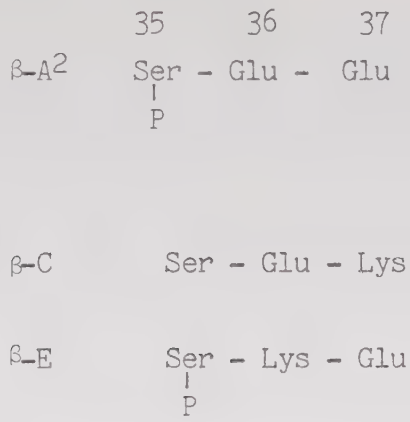
Pour C-A^2, lire α_{s1}-Cn^C - β-Cn^{A^2}, etc...
Les diverses combinaisons dérivent les unes des autres par mutation, soit au locus α_{s1}-Cn, soit au locus β-Cn (flèches). La combinaison

α_{s1}-Cn^C - β-Cn^{A^2} est considérée comme étant la combinaison originelle. E
italiques : combinaisons communes aux bovins et aux zébus ; en caractères gras : combinaisons n'ayant été trouvées que chez les bovins ; la combinaison α_{s1}-Cn^C- β-Cn^D n'a été trouvée que chez des zébus ; sur ce schéma figure également la combinaison α_{s1}-Cn^E- β-Cn^{A^2}, découverte chez des yaks (Bos poëphahus) népalais et mongols (GROSCLAUDE et al., 1976 a
(D'après GROSCLAUDE, 1979).

- Dans le variant β -D, le remplacement, par une lysine, d'une phosphosérine, située respectivement en position n + 1 et n + 3 par rapport à deux sérines phosphorylées n'affecte la phosphorylation d'aucun de ces deux sites :



- Mais le plus bel exemple est fourni par la comparaison des variants β -A2 (GROSCLAUDE et al.,1974 b), β-C et β -E.



On voit que la même substitution d'acides aminés, Glu→ Lys, n'affecte pas la phosphorylation du résidu séryle (en position n) lorsqu'elle survient en position n + 1, mais supprime cette phosphorylation quand elle survient en position n + 2. Ces observations confirment le rôle déterminant attribué par MERCIER et al. (1981) au résidu acide situé deux résidus après un résidu phosphorylable.

Conclusion.

Les résultats de tous ordres obtenus sur les variants électrophorétiques des lactoprotéines forment un ensemble riche d'informations qui n'a pas d'équivalent, actuellement, pour d'autres protéines animales.

Toutefois, à ce stade, il restait une lacune dans nos résultats : l'analyse biochimique des variants de la caseine α_{s2}, recemment decouverts, n'avait pas été faite. Or deux de ces variants, les mieux identifies sur le plan genetique des 3 mis en évidence, présentaient un comportement électrophorétique assez inhabituel :

. . . / . . .

- Dans le variant α_{s2}-C, observé chez le yak, la position et l'intensité relatives des diverses bandes différait de celle du variant de référence.

- Dans le variant α_{s2}D, observé chez des bovins de l'est de la France, l'ensemble des bandes montrait un décalage d'une ampleur inusitée.

Il nous a donc paru intéressant de procéder à une analyse biochimique de ces deux variants, pour tenter d'expliquer leur comportement électrophorétique, et compléter ainsi l'étude générale entreprise sur les lactoprotéines du genre Bos.

IV.MATERIEL ET METHODES.

1.Origine des caséines.

Comme il est difficile de séparer les deux variants de caséine d'une vache hétérozygote, puisque les différences entre ces variants (charge, parfois longueur de la chaîne polypeptidique) sont en général minimes, nous avons recherché pour notre étude des laits individuels d'animaux homozygotes au locus α_{s2}-Cn, ou mieux encore, aux 4 loci des caséines, ce qui limite l'hétérogénéité de la"caséine entière" qui sert de base à la préparation.

La caséine α_{s2}D a ainsi été purifiée à partir d'un lait d'une vache de race Vosgienne, homozygote pour la combinaison allélique α_{s1}-Cn^B - α_{s2}-Cn^D β-Cn^{A2} - κ-Cn^B.

La caséine α_{s2}C provient d'un lait de Yak de Mongolie, également homozygote aux 4 loci de structure des caséines. La combinaison allélique est la suivante : α_{s1}-Cn^C - α_{s2}-Cn^C -β -Cn^{A2} - κ -Cn^A.

2.Rappels sur les électrophorégrammes des variants de la caséine α_{s2}.

La figure 3, qui représente, de manière schématique les électrophorégrammes à pH alcalin des variants α_{s2}A, B, C et D est rappelée après.

Sur cette figure les bandes du variant de référence, α_{s2}A sont numérotées 2,3,4 et 6 selon la nomenclature d'ANNAN et MANSON (1969). Rappelons que selon BRIGNON et al. (1976), ces quatre fractions qui sont constituées d'une même chaîne polypeptidique (celle de la caséine α_{s2}) ne diffèrent que par leur degré de phosphorylation (13, 12, 11 ou 10 groupements phosphate par mole).

Par homologie avec le variant de référence α_{s2}A, les bandes du variant α_{s2}D qui paraissent simplement decalees vers la cathode, ont egalement été numérotées 2,3,4 et 6. Par contre, les fractions du variant α_{s2}C ne peuvent pas être numérotées par simple homologie avec le variant de référence, car on

. . . / . .

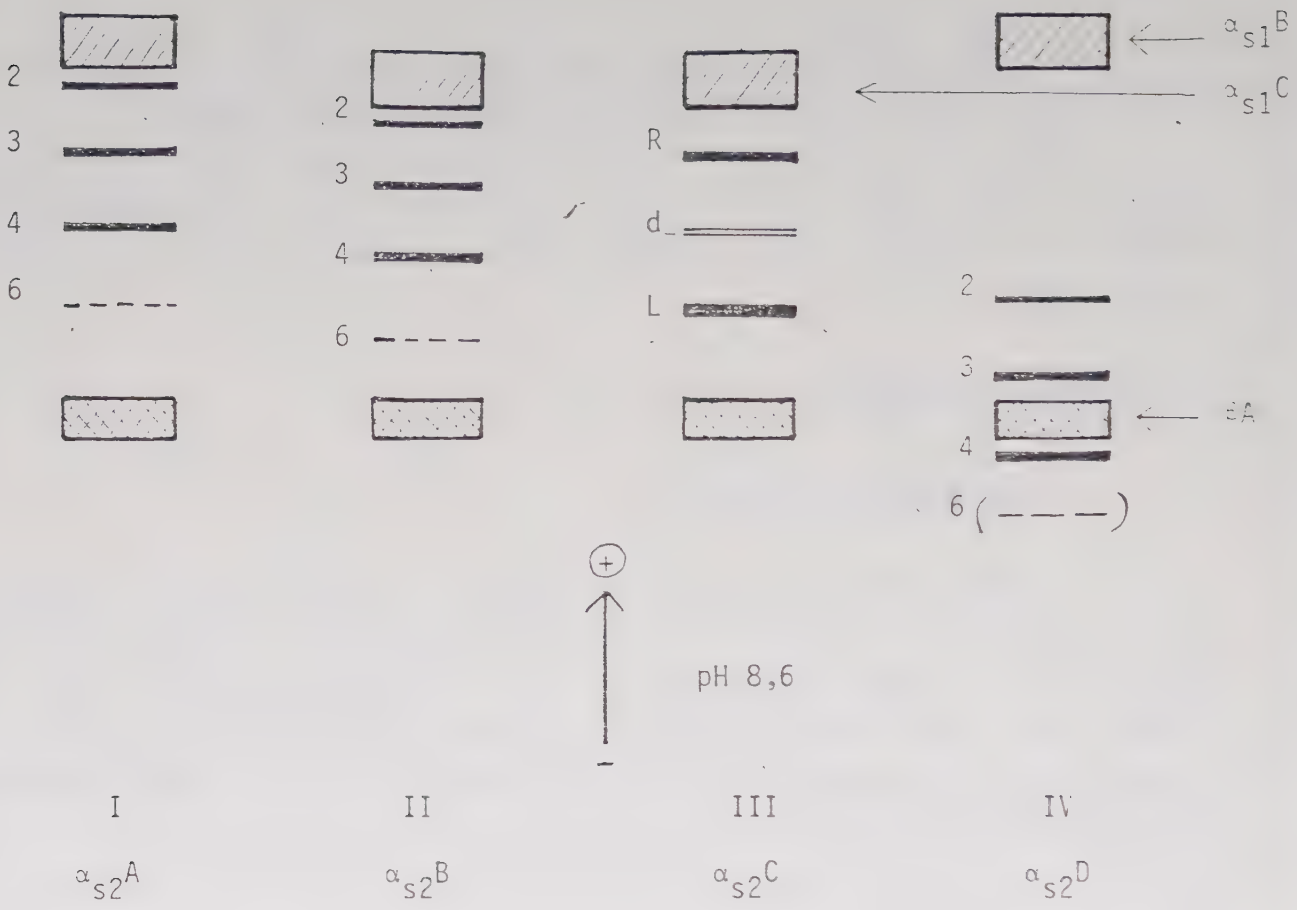


Figure 3. Représentation schématique des variants électrophorétiques de la caséine α_{s2} dans le genre Bos.

Electrophorèse en gel d'amidon avec urée et β-mercaptoéthanol (pH 8,6)

Les variants α_{s2}^A, α_{s2}^B, α_{s2}^D comportent 4 bandes numérotées 2, 3, 4 et 6 selon la nomenclature d'ANNAN et MANSON (1969). La bande 6 du variant α_{s2}^D est représentée entre parenthèse car migrant dans la zone de bandes de caséine κ, elle n'a pas, en fait, été identifiée au cours de cette étude.

Le variant α_{s2}^C comporte 3 bandes principales, L et R, et un doublet.

A noter que les variants α_{s2}^B et α_{s2}^C sont toujours associés au variant α_{s1}^C.

ne retrouve plus ici le même échelonnement dans l'intensité des bandes électrophorétiques ; elles sont donc identifiées par une nomenclature différente.

3. Préparation des fractions de la caséine α_{s2}.

3-1. Préparation de la caséine entière.

Après écrémage du lait par simple centrifugation, la caséine totale est précipitée par acidification au point isoélectrique (pH : 4,6), à 37°C, par addition lente d'HCl N. Le précipité lavé plusieurs fois à l'eau distillée est redissout à pH : 7,0, avec de la soude N. L'opération est renouvelée une seconde fois et le précipité obtenu redissout à pH : 7,0, est lyophilisé.

3-2. Préparation chimique de la caséine α_{s2} brute.

Comme certaines des fractions des variants $\alpha_{s2}C$ et surtout $\alpha_{s2}D$ migrent, en électrophorèse, au niveau de la caséine β , et ont donc une charge nette très voisine de celle de cette caséine, leur purification sur colonne de chromatographie à partir de la caséine était à priori aléatoire. Il a donc paru judicieux d'appliquer à la caséine entière, un protocole de fractionnement chimique combinant les méthodes dites de THOMPSON et KIDDY (1964), et de ZITTLE et CUSTER (1963).

a. Méthode de THOMPSON et KIDDY.

Cette méthode est basée sur l'observation (HIPP et GROVES, 1952) que les caséines qui sont solubles dans l'urée 6,6 M à pH 4,7, ne le sont plus dans l'urée 3,3 M et précipitent, à l'exception de la caséine β qui reste soluble dans ces conditions.

Le protocole retenu, légèrement différent seulement de celui de THOMPSON et KIDDY (1964) est le suivant : 20 g de caséine entière sont dissous dans 400 ml d'urée 6,6 M. Le pH de la solution est ajusté à 4,9. Cette solution est ensuite diluée à 3,3 M d'urée, par addition d'eau distillée. Le pH est alors d'environ 4,7. Le surnageant contient essentiellement la caséine β , faiblement contaminée par de la caséine α_{s2}. Le précipité, qui contient donc les caséines α_{s1}, α_{s2} et κ est redissout dans l'eau distillée, en ajustant le pH à 7,0, puis lyophilisé.

b. Méthode de ZITTLE et CUSTER.

La méthode de ZITTLE et CUSTER (1963) permet de séparer la caséine α_{s1} des caséines α_{s2} et κ . Elle consiste à insolubiliser ces

.../...

deux dernières caséines dans un mélange d'eau et d'éthanol absolu (volume à volume) à pH 7,0, en présence d'acétate d'ammonium 2 M.

3-3. Séparation des fractions de la caséine α_{s2} sur DEAE cellulose.

Après application du protocole de fractionnement précédent, le mélange contenant essentiellement les caséines α_{s2} et κ est chromatographié sur colonne de DEAE cellulose microgranulaire DE 23 dans un tampon urée 3,3 M, imidazole 0,02 M, pH 7,0 en présence de β-mercaptoéthanol (0,3 %) selon la technique de MERCIER et al. (1968). Les différentes fractions sont éluées successivement par un gradient linéaire en molarité de chlorure de sodium (0 à 0,32 M Nacl/l).

La détection des caséines se fait par enregistrement de la densité optique sur un appareil ISCO modèle UA5 à la longueur d'onde λ = 280 nm, ou par lecture directe à l'aide d'un spectrophotomètre ZEISS.

Chaque fraction est dialysée et lyophilisée à pH 7,0 et peut être analysée par électrophorèse en gel d'amidon à la concentration de 1,2 % selon les techniques habituelles.

3-4. Purification des fractions de caséine α_{s2} sur hydroxyapatite.

La fixation des protéines sur l'hydroxyapatite est principalement due aux interactions entre les ions Ca^{++} du support et les groupements chargés négativement des protéines (BERNARDI, 1973).

Après fixation des fractions de caséine dans la colonne, l'élution se fait, en tampon phosphate de pH 7,0, par gradients successifs de molarité, en utilisant les phosphates mono et dipotassique (0,005 à 0,25 M) selon ADDEO et al.(1977).

Cette technique a permis une meilleure purification des fractions de caséine α_{s2}, à la fois des autres fractions de la même caséine, et des contaminations des autres caséines.

A noter que pour éliminer toute trace des ions phosphate qui fausserait le dosage des groupements phosphate covalents de la caséine α_{s2}, les fractions issues de la colonne d'hydroxyapatite sont filtrées sur colonne de Sephadex G50 en tampon bicarbonate, 0,1 M, pH 7,8.

4. Réduction et S-carboxyméthylation.

La caséine α_{s2} comporte 2 cystéines par mole. L'existence de ponts disulfures, par les conséquences qu'elle entraîne sur la structure de la protéine, peut la rendre moins accessible aux enzymes. On applique donc, avant toute fragmentation de la chaîne polypeptidique, un protocole de réduction et alkylation qui est le suivant : la réduction s'effectue à pH 8,0 dans un tampon urée

.../...

8 M, véronal 0,1 M en présence de β-mercaptoéthanol pendant au moins 3 heures sous azote. La protéine (concentration à 1 p. cent) est ensuite alkylée à pH 9,0, à l'abri de la lumière par un excès d'acide iodacétique pendant une durée de 15 à 20 minutes. La réaction est stoppée en abaissant le pH à 5,0. La solution est ensuite dialysée contre l'eau distillée et lyophilisée.

5. Fragmentation chimique ou enzymatique de la caséine α_{s2}.

5-1. Hydrolyse par le bromure de cyanogène (CNBr).

Comme pour beacoup d'autres protéines,et en raison du faible nombre de résidus méthionyle, une hydrolyse de la caséine α_{s2} par le bromure de cyanogène permet de fractionner la chaîne polypeptidique en un nombre de fragments assez réduit (5) qui une fois purifiés, peuvent être recoupés en fragments plus petits par des enzymes. Le protocole d'hydrolyse de la caséine α_{s2} est le suivant : la caséine est dissoute dans l'acide formique 70 % (v/v) à la concentration moyenne de 1 µ M/ml. La réaction se fait à température ambiante pendant 24 heures en présence de bromure de cyanogène (le rapport molaire CNBr/Met est de l'ordre de 100). La liaison Met-X est rompue et la méthionine est oxydée en homosérine lactone. La solution est ensuite desséchée à l'évaporateur rotatif.

5-2. Hydrolyses par les enzymes.

5-2.1. Trypsine.

Cette enzyme, d'une très grande spécificité, rompt les liaisons Lys - X ou Arg - X dans les conditions suivantes. La caséine (ou le peptide, quand il s'agit par exemple d'un gros fragment CNBr) est dissoute dans une solution de bicarbonate d'ammonium 0,1 M à pH 7,8. Une solution de trypsine traitées au TPCK, qui inhibe éventuellement l'action du contaminant chymotrypsine et préparée extemporanément, est ajoutée au substrat dans le rapport : E/S = 1/50 (mole/mole). L'hydrolyse dure en moyenne 2 heures à 37°C. La réaction est stoppée par acidification avec HCl N. Les peptides ainsi obtenus sont desséchés à l'aide d'un évaporateur rotatif, sous vide.

5-2.2. Thermolysine.

[illegible] coupe préférentiellement [illegible] que :

X - Val, X - Ile ou X - Phe.

...../...

La technique utilisée est celle de MATSUBARA et al. (1965) légèrement modifiée: : le peptide est solubilisé dans un tampon N-éthylmorpholine 0,2 M à pH 8,0 auquel on ajoute une goutte de chlorure de calcium 0,2 M qui joue un rôle de catalyseur. La thermolysine dissoute dans un volume minimum d'eau distillée est additionnée au substrat dans le rapport E/S : 1/100 (mole/mole). La réaction s'effectue durant 1 heure au moins et 2 heures au plus à 37°C. En effet, l'hydrolyse (contrôlée par électrophorèse sur papier) apparaît souvent dans ces conditions comme suffisante et quasi complète. La solution est ensuite desséchée sous courant d'azote, ou à l'évaporateur rotatif sous vide.

6. Purification des peptides.

Selon la technique utilisée pour fractionner la chaîne polypeptique de la caséine α_{s2}, on obtient un mélange de peptides de caractéristiques assez différentes. La purification de ces peptides a fait appel, selon les cas à l'une des techniques de fractionnement sur colonne (filtration sur gel ou chromatographie sur échangeur d'ions) et aux techniques de fractionnement par électrophorèse ou chromatographie sur papier.

6-1.Techniques de chromatographie sur colonne.

6-1.1. Filtration moléculaire.

Elle est effectuée sur colonne de Sephadex G50 fine (hauteur: 1,60 m ; diamètre: 2,2 cm ; débit: 30 ml/h, fractions:5 ml) en solution d'acide acétique à 30 %, à la température du laboratoire. Dans certains cas, un tampon urée 3,3 M, chlorure de sodium 0,5 M et acide acétique 30 %, plus réducteur a été utilisé.

En milieu urée, le repérage des différentes fractions se fait par lecture directe à l'aide d'un spectrophotomètre, à la longueur d'onde λ = 280 nm.

En milieu sans urée, le repérage des peptides se fait par hydrolyse alcaline d'une aliquote prélevée dans chacune des fractions collectées en présence de soude 5 N à 100° pendant 2 heures 30. L'hydrolysat d'acides aminés ainsi obtenu est alors quantifié par réaction à la ninhydrine pendant 20 minutes selon la technique de HIRS et al. (1956). L'absorbance se lit à la longueur λ =570 nm.

6-1.2. Chromatographie sur échangeur d'ions.

Les chromatographies sont effectuées sur colonne de résine Dowex AG 50 WX2. traitée selon SCHROEDER et al. (1962). La résine est mise en suspension dans un tampon de départ : pyridine-acide acétique-eau (64,5 : 1114 : 2821,5 v/v/v) de pH 3,1. Avant le dépôt de l'échantillon sur colonne, la

pH de clui-ci est ajusté à la valeur 2 avec de l'acide formique concentré.

L'élution des peptides est réalisée par un gradient linéaire en molarité de pyridine en utlisant le tampon précédent (pH 3,1) et un second tampon pyridine-acide acétique-eau (645:573:2782 v/v/v) de pH 5,0 à 37°C.

A la fin du gradient les peptides encore fixés sur la colonne sont élués par un tampon de pH 5,28, à forte concentration en pyridine (1290:400 : 2310 v/v/v).

La détection des fractions contenant des acides aminés aromatiques tels que la phénylalanine et la tyrosine se fait à la longueur d'onde de 280 nm. Cependant, pour établir l'ensemble du chromatogramme, une hydrolyse alcaline a toujours été effectuée comme ci-dessus (cf.6-1.2.).

6-2.Recherche des peptides par électrophorèse et chromatographie sur papier.

L'électrophorèse et la chromatographie sur papier dont le pouvoir résolutif est élevé se prêtent bien non seulement à l'identification de peptides mais aussi à la séparation de petites quantités de peptides, lorsque la taille des peptides est assez faible (jusque vers 20-30 résidus). Les deux techniques peuvent, si nécessaire, être mises en oeuvre successivement.

6-2.1.Technique d'électrophorèse sur papier.

Les électrophorèses sont effectuées sur papier Whatman 3 MM, à l'aide d'un appareil à haute tension (jusqu'à 5 000 volts) de marque GILSON en se plaçant en général dans l'une ou l'autre des conditions suivantes :

- tampon pH 1,9 : acide acétique-acide formique-eau (87 : 25 : 888 v/v/v) ;
- tampon pH 4,7 : pyridine-acétique-eau (2 : 2 : 96 v/v/v) dilué au 1/9e.

La tension appliquée est de l'ordre de 60 v/cm et la durée d'électrophorèse est d'environ 30 minutes.

6-2.2.Technique de chromatographie sur papier.

Les chromatographies sont effectuées à température ambiante dans le sens descendant, pendant 12 à 16 heures avec l'un ou l'autre des tampons suivants :

I : butanol-pyridine-acide acetique-eau (120:80:24:96: v/v/v/v).

II : butanol-acide acétique-eau (200:30:75 v/v/v).

..../...

6-2.3. Révélation non spécifique des peptides.

Après électrophorèse ou chromatographie, les feuilles de papier Whatman sont séchées dans une étuve ventilée, à 50°C environ. Elles sont ensuite trempées dans un réactif ninhydrine-collidine (95 ml éthanol - 50 ml collidine - 1 g ninhydrine) et séchées à nouveau dans l'étuve. Les peptides se révèlent sous forme de taches bleues.

6-2.4. Révélation spécifique de certains peptides.

Dans le cas où les peptides renferment des résidus d'acides aminés tels que His, Tyr, Trp ou Arg, ils peuvent être colorés sélectivement par des réactifs spécifiques de ces acides aminés.

Le réactif de PAULY colore l'histidine en rouge et la tyrosine en violet (BLOCK et al.,1962), y compris dans un peptide déjà coloré par la ninhydrine.

Avec le réactif d'EHRLICH, le tryptophane se colore en rose violacé (SMITH, 1953). Si le peptide a préalablement été coloré à la ninhydrine, il doit,avant mise en oeuvre du réactif d'EHRLICH, être décoloré à l'aide d'un mélange acétone-HCL (90/10 v/v).

Le réactif de SAKAGUCHI donne avec l'arginine une coloration rouge (CANFIELD et ANFINSEN, 1963). Son efficacité est meilleure en l'absence de coloration préalable à la ninhydrine.

7. Détermination des compositions en acides aminés.

7-1. Hydrolyse acide.

Les peptides sont hydrolysés pendant 24 heures à 110°C, dans des tubes scellés sous vide contenant 1,5 ml de HCL 5,7 N, redistillé 3 fois.

Cependant, ces conditions peuvent ne donner, pour certains résidus, qu'une valeur assez imprécise :

- la sérine et la thréonine sont partiellement détruites ce qui conduit à sous estimer leur teneur :
- certaines liaisons (Ile-Ile,Val-Val,Ile-Val, Val-Ile) sont par ailleurs mal hydrolysées après 24 heures d'hydrolyse, ce qui peut également conduire à des erreurs.

On procède donc, surtout dans le cas de peptides moyens ou longs, à la réalisation d'hydrolyses de durée différente (24, 48 et 96 heures). Les valeurs ainsi obtenues permettent des estimations plus précises, par extrapolation à 0 pour les hydroxyaminoacides, par prise en compte des valeurs mesurées à 48 et 96 heures pour l'isoleucine et la valine.

. . . . / . . .

Après hydrolyse, le contenu des tubes est desséché sous vide. Pour estimer approximativement la quantité d'hydrolysat disponible pour les dosages sur analyseur une aliquote de cet hydrolysat est examinée par électrophorèse sur papier à pH 1,9 par référence à un mélange d'acides aminés témoin (5 µl) de concentration égale à 2,5 µ moles/ml.

7-2. Dosage des acides aminés par analyseur.

Le dosage est effectué selon SPACKMAN et al.(1958) à l'aide d'un analyseur BECKMAN "Multichrom" équipé pour mesures rapides selon HUBBARD et KREMEN (1964) et couplé à un intégrateur "spectra physics" Autolab AA. La résine utilisée, analogue au Dowex, est de marque Durrum DC 6 A. Les acides aminés acides, neutres et basiques sont élués successivement à l'aide de 3 tampons de pH 3,25, 4,25, 5,28. Les résultats d'analyse fournis par l'intégrateur sont exprimés en nombre de résidus par mole de peptide.

8. Détermination de séquences d'acides aminés.

8-1.Principes.

La technique de détermination d'une séquence d'acides aminés la plus performante est actuellement la technique de dégradation récurrente d'EDMAN. Or cette technique ne permet d'établir, en moyenne, que des séquences de 20 à 40 résidus. L'élucidation de la séquence des acides aminés d'une protéine nécessite donc, obligatoirement le fractionnement de cette protéine en peptides. D'autre part, il est nécessaire de procéder à deux fractionnements aux moins de la protéine, en des sites différents, de manière à pouvoir, par recoupements (en anglais "overlap") déterminer l'ordre des divers peptides dans la chaîne polypeptidique.

Après purification, chaque peptide est d'abord défini par l'établissement de sa composition globale en acides aminés. L'utilisation d'exopeptidases permet ensuite, en général, d'identifier les résidus constituant les extrémités N- et C- terminales du peptide. La technique de base, pour l'établissement de la séquence des acides aminés d'un peptide,reste la technique d'EDMAN ; on peut toutefois faire appel, dans certains cas, à la spectrométrie de masse.

8-2. Séquences N-et C-terminales : action des exopeptidases.

Les enzymes les plus fréquemment utilisés pour dégrader les extrémités N- ou C-terminales d'une protéine ou d'un peptide sont les carboxypeptidases A et B et la leucine aminopeptidase.

- La carboxypeptidase A (CPA), agit à l'extrémité C-terminale du peptide, libérant surtout les acides aminés neutres, sauf la proline, et la glycine, et moins aisément les acides aspartique et glutamique ainsi que l'histidine

- La leucine aminopeptidase (LAP) agit à l'extrémité N-terminale du peptide. Elle est capable en général de libérer les différents acides aminés, sauf la proline, l'acide pyroglutamique, et les acides aminés impliqués dans une liaison X-Pro.

Le pH optimum d'action de ces enzymes se situe autour de 8, et leurs conditions d'utilisation sont similaires : une quantité d'environ 0,1 (µMole de peptide est dissoute dans 0,3 ml du tampon N-éthylmorpholine 0,2 M, de pH 8,0. Après addition de 2 à 5 µl d'enzyme et une goutte de $MgCl_2$ 0,02 M pour la LAP, l'hydrolyse s'effectue à 37°C, pendant une durée pouvant aller, selon les situations, de 1 à 24 heures. Selon la nature des liaisons peptidiques, certains acides aminés sont libérés plus facilement que d'autres ; les rendements restent donc souvent inférieurs à 100 %.

Le résultat de l'action des exopeptidases peut être suivi par électrophorèse sur papier. Il est quantifié sur analyseur d'acides aminés.

8-3. Dégradation récurrente d'EDMAN.

Cette méthode permet de déterminer une séquence d'acides aminés par enlèvement successif des acides aminés à partir de l'extrémité N-terminale. Chaque cycle de dégradation s'effectue de la manière suivante :

a) Couplage du groupement N-terminal de l'acide aminé avec le phénylisothiocyanate (PITC) pour former une phénylthiocarbamyl-protéine (à pH 9,5).

. b) Clivage, en milieu anhydre, avec l'acide trifluoracétique, de la liaison peptidique liant le premier acide aminé au second ; il y a libération du phénylthiocarbamyl acide aminé qui se cyclise en donnant un dérivé thiazolinone instable.

Ces deux opérations (a et b) peuvent être effectuées automatiquement, à l'aide d'un séquenceur BECKMAN 890 B, muni d'un système à balayage d'azote. La dégradation est plus rapide que celle effectuée manuellement et elle peut aller, le plus souvent, beaucoup plus loin dans la chaîne peptidique.

c) Conversion du résidu thiazolinone en un dérivé phénylthiohydantoine plus stable (PTH amino-acide).

d) Identification des PTH acides aminés par deux techniques différentes :

- chromatographie sur couche mince sur un gel de silice contenant un indicateur de fluorescence (MERCK F 254) selon la technique de COHEN [illegible] :

- chromatographie en phase gazeuse, à l'aide d'un chromatographe BECKMAN GC 65 à ionisation de flamme, après silylation des PTH acides aminés, ce qui les rend plus volatils, selon PISANO et al. (1972).

..../...

Les PTH d'acides aminés basiques (His, Arg) qui restent dans la phase aqueuse inférieure au cours des extractions d'excès de réactifs, parce que non solubles dans les solvants organiques, peuvent être caractérisés sur papier par des réactifs spécifiques : selon les techniques de YAMADA et ITANO (1966) pour l'arginine, et BLOCK et al. (1962) pour l'histidine.

8-4. Spectrométrie de masse.

La séquence partielle de deux peptides en mélange a été établie à l'aide d'un spectromètre AEI MS9 à l'Institut de Chimie des substances naturelles du C.N.R.S. de Gif sur Yvette. Les peptides (10 à 12 résidus au maximum) sont d'abord acétylés avec de l'anhydride acétique normal et deutérés dans les mêmes proportions, puis perméthylés avec du diméthylsulfoxyde (DMSO) et de l'hydrure de sodium selon DAS et LEDERER (1971) afin de les rendre plus volatils.

9.Recherche et dosage des groupements prosthétiques.

9-1.Recherche des acides sialiques.

Pour rechercher si, comme dans la caséine κ, l'hétérogénéité de la caséine α_{s2} pouvait être due à la présence de sucres, et plus précisément à des différences de teneur en acides sialiques, des essais d'action de la neuraminidase ont été effectués. En effet, cette enzyme a pour propriété de libérer les groupements N-acétyl neuraminiques situés à l'extrémité libre de la chaîne glycane.

Le protocole est le suivant : 5 mg de caséine α_{s2} lyophilisée sont dissouts dans 250 µl de tampon acétate de sodium 0,1 M, de pH 5,0. A cette solution, on ajoute 250 µl de neuraminidase de Clostridium perfringens. L'hydrolyse est effectuée à 37°C pendant 24 heures. La solution est désséchée sous courant d'azote. Après cet essai, la caséine est soumise à un test de mobilité électrophorétique en gel d'amidon à pH 8,6 par référence à un échantillon de la même caséine non traitée.

9-2.Dosage des groupements phosphate.

La caséine α_{s2} bovine est une phosphoprotéine. Les résultats de BRIGNON (1979) indiquent que les différentes fractions du variant de référence diffèrent par leur teneur en groupements phosphate (13, 12, 11 et 10 groupements respectivement, pour les fractions α_{s2}, α_{s3}, α_{s4} et α_{s6}). La recherche et le dosage des groupements phosphate ont donc été effectués sur les fractions purifiées des deux variants qui font l'objet du present travail.

A cet effet, deux techniques ont été utilisées : l'hydrolyse ménagée qui permet de repérer la présence de résidus phosphoséryle ou phosphothréonyle, et le dosage colorimétrique qui permet de quantifier le phosphore.

..../...

9-2.1.Hydrolyse ménagée.

Une quantité d'environ 0,1 µ Mole de caséine ou de peptide, est dissoute dans 1 ml de HCl 5,7 N. Le tube scellé sous vide est mis en étuve à 110° pendant 5 heures en moyenne, selon la technique de BYLUND et al. (1976). L'hydrolysat est ensuite desséché sous vide et soumis à une électrophorèse sur papier à pH 1,9 (3 000 v pendant 45 mn) en présence de témoins d'acides aminés phosphorylés (P-Ser et P-Thr).

Lorsque ces acides aminés sont présents dans l'hydrolysat on effectue ensuite un dosage quantitatif sur le peptide ou la caséine.

9-2.2.Dosage colorimétrique.

La méthode utilisée est celle de FISKE et SUBARROW (1925) modifiée par BAMAN et al.(1948).

La protéine (ou le peptide) est détruite par action de l'acide sulfurique concentré et chaud. L'addition de molybdate d'ammonium conduit à la formation, avec les groupements phosphate libres, de phosphomolybdate d'ammonium. Celui-ci donne un dérivé bleu en présence d'un réducteur et d'acide aminonaphtolsulfonique. La densité optique se lit à λ = 650 nm.

Le nombre de groupements phosphate est calculé à l'aide d'une gamme étalon de phosphate de potassium (KH_2PO_4), soumise parallèlement au même protocole.

V.CARACTERISATION DU VARIANT α_{s2}-D.

1.Ligne directrice de l'étude.

L'établissement de la séquence des acides aminés d'une protéine reste une entreprise assez longue. Il ne peut donc être question de traiter chaque variant électrophorétique comme on le ferait pour une protéine nouvelle. La stratégie d'étude d'un variant consiste plutôt à rechercher d'abord le ou les peptides qui diffèrent de ceux de la protéine de référence. Puisqu'il s'agit d'un variant qui se distingue par électrophorèsè, on recherchera donc le ou les peptides porteurs de l'altération, ou des altérations responsables de la différence de mobilité. Après identification ce ou ces peptides sont purifiés, et leur structure est établie. Lorsque les conclusions de ce travail permettent d'expliquer la différence de mobilité entre le variant à l'étude et la protéine de référence, on admet que la ou les différences ainsi observées sont celles qui caractérisent

.....

le variant. Mais il est clair que dans ces conditions des différences non décelables par électrophorèse passeront en général inaperçues. La stratégie adoptée est donc bien limitée à la recherche des altérations affectant la mobilité électrophorétique de la protéine.

De manière générale, la technique du "fingerprint" se prête bien à la recherche des variations de mobilité électrophorétique des composants d'un hydrolysat peptidique. Toutefois, cette technique ne s'applique pas parfaitement aux caséines, en raison du comportement de certains peptides, les phosphopeptides notamment dont la définition, sur le chromatogramme, est assez imprécise. Dans ces conditions, l'orientation des investigations sur le α_{s2}-D a été guidée par les observations et considérations suivantes :

- Le patron général de la caséine α_{s2} (nombre et intensité relative des bandes) ne paraît pas affecté ; toutes les bandes paraissent décalées de la même manière vers la cathode. L'altération spécifique de covariant touche ainsi une partie commune à toutes les bandes, donc n'affecte pas un site de phosphorylation différentiel.

- Compte-tenu de la grande différence de mobilité relative, l'altération caractérisant le variant α_{s2}-D ne peut être une simple substitution d'acides aminés ; la différence porte au moins sur 6 charges négatives.

- Le variant α_{s2}-D présente par ailleurs une migration plus cathodique à pH 3,0. Ceci suggère que l'altération porte, notamment, sur des phosphoaminoacides.

Il paraissait judicieux de rechercher l'altération spécifique du variant α_{s2}-D dans des phosphopeptides, et plus précisément dans ceux communs aux diverses fractions de la caséine α_{s2}.

Pour limiter l'hétérogénéité de la caséine de départ, il a par ailleurs semblé préférable d'opérer sur l'une des fractions, et non sur l'ensemble de celles-ci. La fraction 3, qui est bien séparée de la caséine β en électrophorèse à pH 8,6, et qui est, quantitativement, plus importante que la fraction 2, a été retenue.

En définitive, la ligne directrice de l'étude du variant α_{s2}-D a donc été de rechercher, à partir de la fraction 3 purifiée, une ou des altérations affectant ou ou des phosphopeptides communs aux diverses fractions de la caséine α_{s2}.

2. Préparation des fractions 2, 3 et 4 de la caséine α_{s2}.

2-1. Séparation [illegible]

Deux techniques successives de fractionnement chimique ont permis d'isoler, dans un premier temps, l'ensemble des caseines α_{s2} et κ des autres

. . . . . .

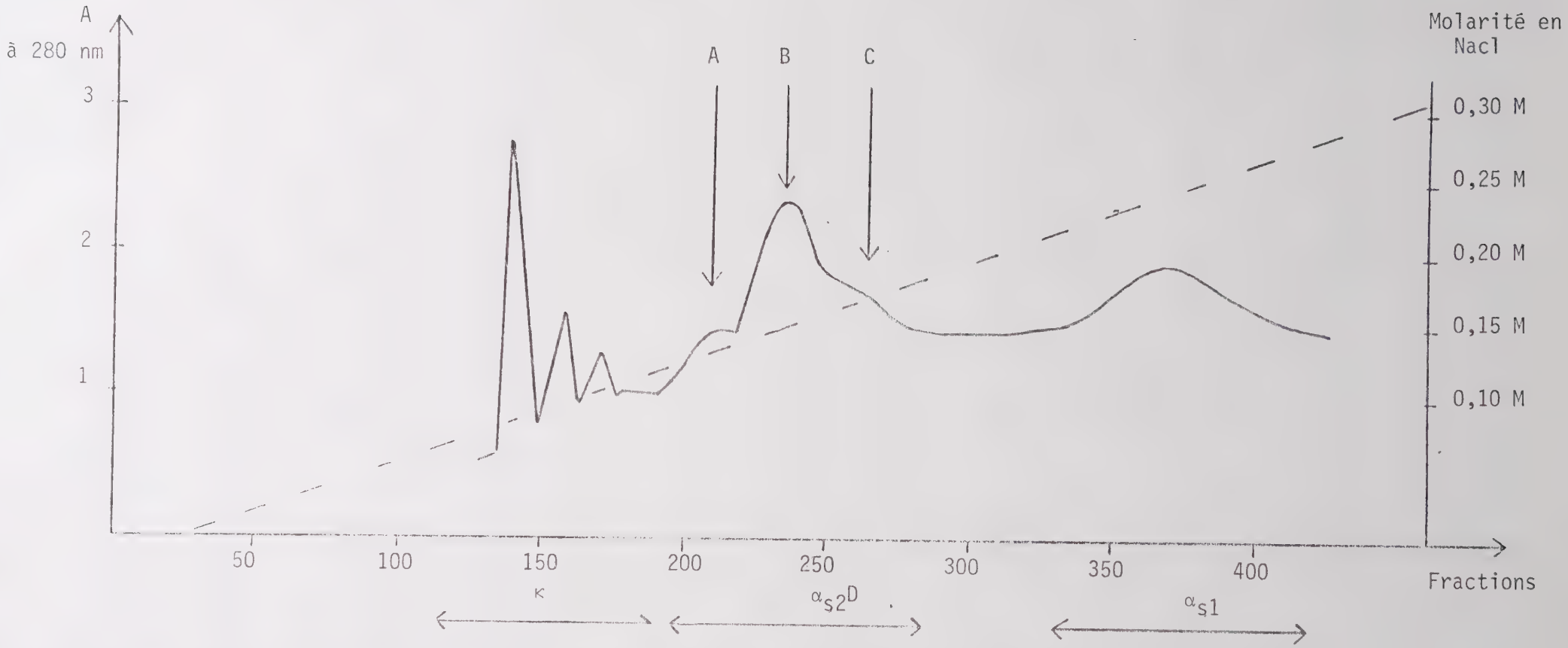


Figure 9 . Chromatographie sur colonne de DEAE cellulose du complexe des caséines α_{s2} et κ du variant α_{s2}^{D}.
Ce complexe a été obtenu à partir de 10 g d'un mélange de caséines α_{s1}, α_{s2} et κ .
Colonne : h : 15 cm ; Ø : 5 cm. Tampon imidazole 0,02 M, urée 3,3 M, β-mercaptoéthanol 0,3 %, pH 7,0.
Température ambiante. Elution : 100 ml/h. Gradient linéaire en molarité de chlorure de sodium (0-0,32 M).
Fractions : 10 ml. Absorbance : λ : 280 nm. Rendement moyen : A : 120 mg ; B : 250 mg ; C : 200 mg.

constituants de la caséine entière (α_{s1} et β). La technique de THOMPSON et KIDDY (1964) permet d'éliminer la caséine β. La technique de ZITTLE et CUSTER (1963) permet, ensuite, de séparer la caséine α_{s1} des deux autres constituants α_{s2} et κ. En pratique, 20 g de caséine entière ont été dissous dans 400 ml d'urée 6,6 M et le pH ajusté à 4,9. Par addition lente du même volume d'eau, il se forme un précipité des caséines α_{s1}, α_{s2} et κ. Le surnageant qui contient la caséine β est séparé par centrifugation. Le précipité est immédiatement redissous dans 400 ml d'eau à pH 7,0 auxquels on ajoute 400 ml d'éthanol absolu. Par addition lente et goutte à goutte d'une solution d'acétate d'ammonium 2 M, il se forme un fin précipité de complexe α_{s2} et κ. Après chaque opération, les constituants des deux phases "précipité" et "surnageant" sont soumis à un test de pureté par électrophorèse en gel d'amidon avec urée et β-mercaptoéthanol à pH 8,6. Les résultats indiquent que le complexe des caséines α_{s2} et κ est quasiment "pur", débarassé en majeure partie des caséines α_{s1} et surtout β qui a sensiblement la même mobilité électrophorétique que la caséine α_{s2} à pH 8,6, et qui pourrait donc n'être séparée qu'assez difficilement de la caséine α_{s2} par chromatographie sur colonne de DEAE cellulose.

2-2. Fractionnement du complexe des caséines α_{s2} et κ sur colonne de DEAE Cellulose.

Le précipité brut recueilli après centrifugation et constitué essentiellement des caséines α_{s2} et κ est aussitôt redissous dans le tampon urée 3,3 M, imidazole 0,02M-HCl, β-mercaptoéthanol (0,3 %) à pH 7,0 avant d'être déposé au sommet de la colonne de DEAE cellulose microgranulaire dans un volume minimum (environ 50 ml). Les caséines se fixent sur l'échangeur par des liaisons électrostatiques et d'autant plus fortement qu'elles contiennent davantage de groupements chargés négativement (Glu, Asp, PO_4^-). Elles sont éluées successivement à température ambiante par un gradient linéaire en molarité de chlorure de sodium allant de 0 à 0,32 M (2,5 l/2,5 l) (figure 9).

Après lecture de la densité optique à la longueur d'onde λ = 280 nm, les fractions correspondant à chaque pic sont rassemblées, dialysées contre l'eau distillée et lyophilisées.

2-3. Examen, par électrophorèse, des fractions issues de DEAE cellulose.

A pH 8,6, l'électrophorégramme de l'ensemble des fractions issues de colonne de DEAE cellulose montre [illegible] respectivement [illegible]. La bande 6 ne peut être distinguée des fractions les plus glycosylées de la caséine κ (figure 10). On note toutefois que les bandes 2, 3 et 4 ainsi séparées res-

. . . / . . .

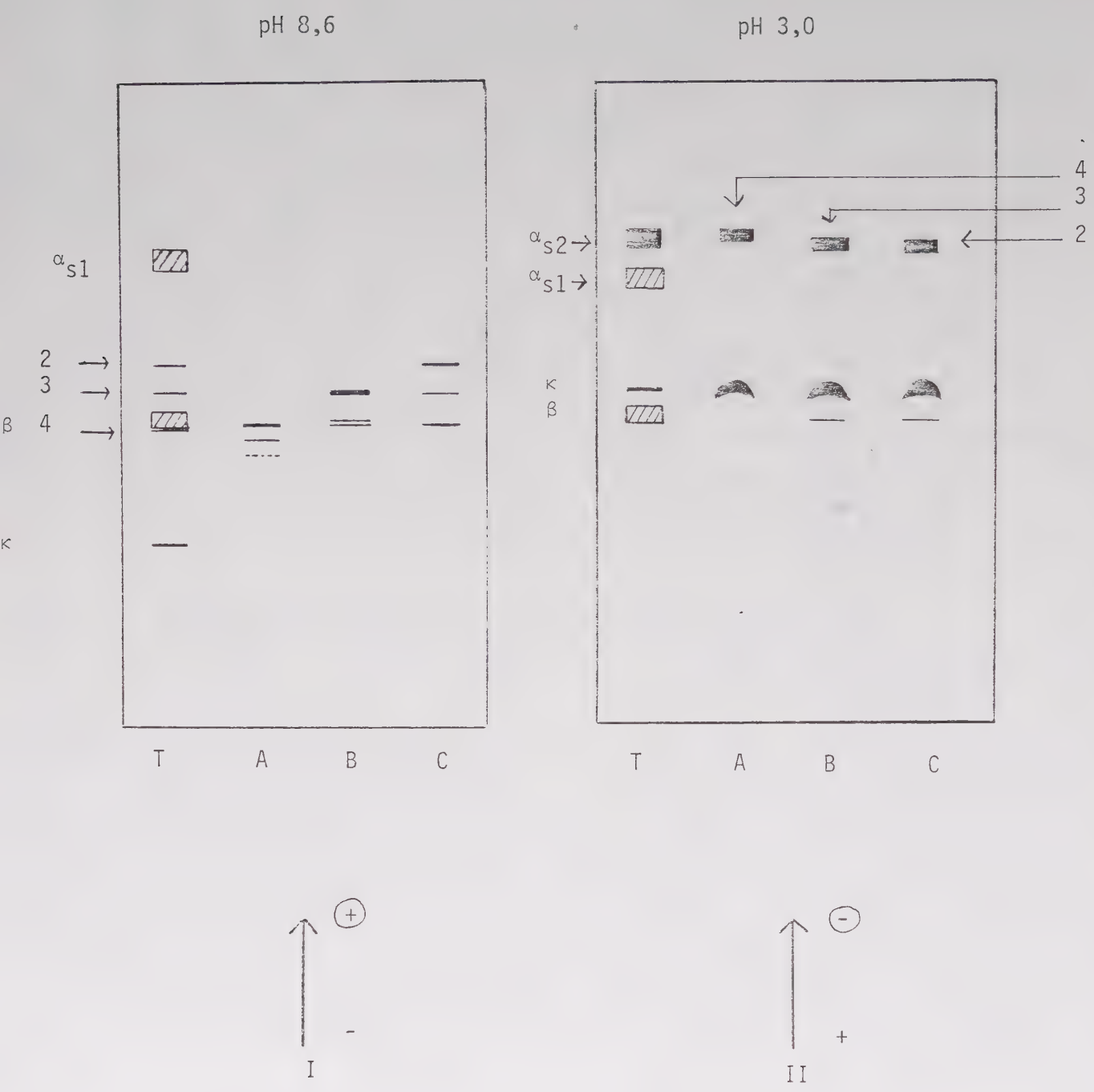


Figure 10 . Electrophorèse des fractions A, B et C issues de la chromatographie du variant α_{s2}D sur colonne de DEAE cellulose (cf. figure 9). Les fractions de chromatographie A, B et C contiennent respectivement les fractions électrophorétiques 4, 3 et 2 du variant α_{s2}D.
T : témoin de caséine "entière".
Electrophorèse effectuée en gel d'amidon avec urée et β-mercaptoéthanol : I : pH 8,6 - II : pH 3,0.

tent faiblement contaminées par des quantités de caséine κ fortement glycosylée et de caséine β dont la teneur ne dépasse guère 10 % du total de chacune des fractions. En outre, il apparaît qu'aucune des fractions de caséine α_{s2} issues de DEAE cellulose, ne se présente sous forme d'une seule bande. Ainsi même la fraction A (bande 4) la plus homogène est vraisemblablement contaminée par la bande 6 ; de manière plus évidente encore, on note la présence d'une petite quantité de bande 4 dans les fractions B (bande 3) et C (bande 2). En fait, les techniques usuelles de chromatographie ne permettent pas de séparer parfaitement des molécules qui, comme les diverses fractions de la caséine α_{s2} ne diffèrent, selon BRIGNON et al (1976) que par les charges d'un groupement phosphate.

- En électrophorèse en gel d'amidon à pH 3,0, chacune des fractions A, B et C présente deux taches dont la plus intense se situe en avant de la caséine α_{s1} et correspond à la caséine α_{s2} ; l'autre, intermédiaire entre β et α_{s1} et de moindre intensité, correspond vraisemblablement à de la caséine κ. Notons qu'à pH 3,0, la mobilité électrophorétique relative des fractions 2, 3 et 4 de la caséine α_{s2} décroit légèrement de la cathode vers l'anode,ce qui concorde avec l'hypothèse selon laquelle les fractions 2 et 3 d'une part, et 3 et 4 d'autre part, diffèreraient par un groupement phosphate, comme dans la protéine de référence (figure 10).

2-4. Préparation d'une réserve de caséine α_{s2} correspondant à la bande 3.

Les opérations décrites précédemment, ont été répétées à 4 reprises, de manière à préparer, à partir de 80 g de caséine entière, 1 g environ de fraction B, correspondant à la bande 3. Cette préparation a servi de matériel de base pour l'analyse biochimique décrite ci-après.

3. Analyse biochimique de la fraction 3 du variant α_{s2}-D.

3-1. Composition en acides aminés.

L'hydrolyse acide a été effectuée sur des aliquotes de 0,01 (2 µMole) de fraction 3, pendant des durées de 24, 48 et 96 heures, et en triple pour chaque durée. Les valeurs obtenues après passage sur analyseur sont données dans le Tableau 8, ainsi que les valeurs entières estimées après corrections. Par comparaison à la composition en acides aminés de la caséine de référence α_{s2}A les résultats obtenus indiquent [illegible]

. . . . . .

Résidus d'acides aminés	Caséine α_{s2}D (fraction 3)		Caséine α_{s2}A (Fraction 3)
Asx	17,63	(18)	18
Thr	14,35	(15)	15
Ser	11,40	(13)	17
Glx	37,50	(38)	40
Pro	9,86	(10)	10
Gly	1,58	(1-2)	2
Ala	8,08	(8)	8
Cys 1/2	(a)	(2)	2
Val	13,25	(14)	14
Met	3,47	(4)	4
Ile	9,21	(10)	11
Leu	14,21	(14)	13
Tyr	10,00	(11)	12
Phe	5,79	(6)	6
His	2,89	(3)	3
Lys	21,84	(24)	24
Arg	5,88	(6)	6
Trp	(b)	(2)	2
P	8,37		12

Tableau 8. Composition en acides aminés et phosphore du variant α_{s2}D (fraction 3)
Entre parenthèses : valeurs exactes estimées à partir d'hydrolysats de 24, 48 et 96 heures.

(a) Non dosé ; les 2 cystéines ont été retrouvées ultérieurement, dans le peptide trypsique où elles sont localisées.

(b) Non dosé mais révélé par coloration spécifique d'EHRLICH dans les peptides trypsiques.

D'autres différences moins significatives (Glu,Ile,Leu, Tyr, Lys) peuvent être observées.

3-2. Dosage du phosphore.

Le dosage du phosphore effectué sur la fraction 3 selon la technique exposée dans Matériel et Méthodes donne une valeur de 8,37, soit 8 groupements phosphate par mole, contre 12 dans la même fraction de la protéine de référence (BRIGNON et al, 1976). Ce déficit en groupements phosphates est à rapprocher du déficit en sérine observé ci-dessus.A ce stade du travail,les résultats obtenus tendaient à renforcer l'hypothèse selon laquelle l'altération spécifique du variant α_{S2}-D touchait, notammment, un phosphopeptide.

3-3. Identification des extrémités N et C-terminales.

La séquence N-terminale de la fraction étudiée a été établie à l'aide du séquenceur. La séquence des 20 premiers résidus d'acides aminés, établie par J-C. MERCIER, et reportée sur la Figure 13, est identique à celle de la protéine de référence.

Les résidus C-terminaux ont été identifiés par action de la carboxypeptidase A (0,05 µM de caséine dissous dans 500 µl de tampon N-éthylmorpholine à pH 8,0 ; 5 µl d'enzyme ; 24 heures, 37°C). Comme dans la protéine de référence les résidus leucyle et tyrosyle ont été libérés.

3-4. Etude des peptides CNBr.

3-4.1. Préparation, composition en acides aminés et éléments de structure des peptides CNBr.

500 mg de caséine α_{S2} (fraction 3) ont été hydrolysés par le bromure de cyanogène avant d'être réduits et alkylés (le variant α_{S2}-A contient 2 Cys /mole). L'hydrolysat ainsi obtenu a été chromatographié sur colonne de Sephadex G 50 (acide acétique 30 %, urée 3,3 M, Nacl 0,5 M).

Comme dans le cas de la protéine de référence, cette chromatographie a fourni quatre fractions, numérotées I, II, III et IV (Figure 11). Les peptides contenus dans ces fractions ont reçu, pour simplifier les comparaisons, la même désignation que les peptides homologues de la protéine de référence. Rappelons que dans cette protéine l'enchaînement et le nombre de résidus des peptides CNBr sont les suivants :

...../...

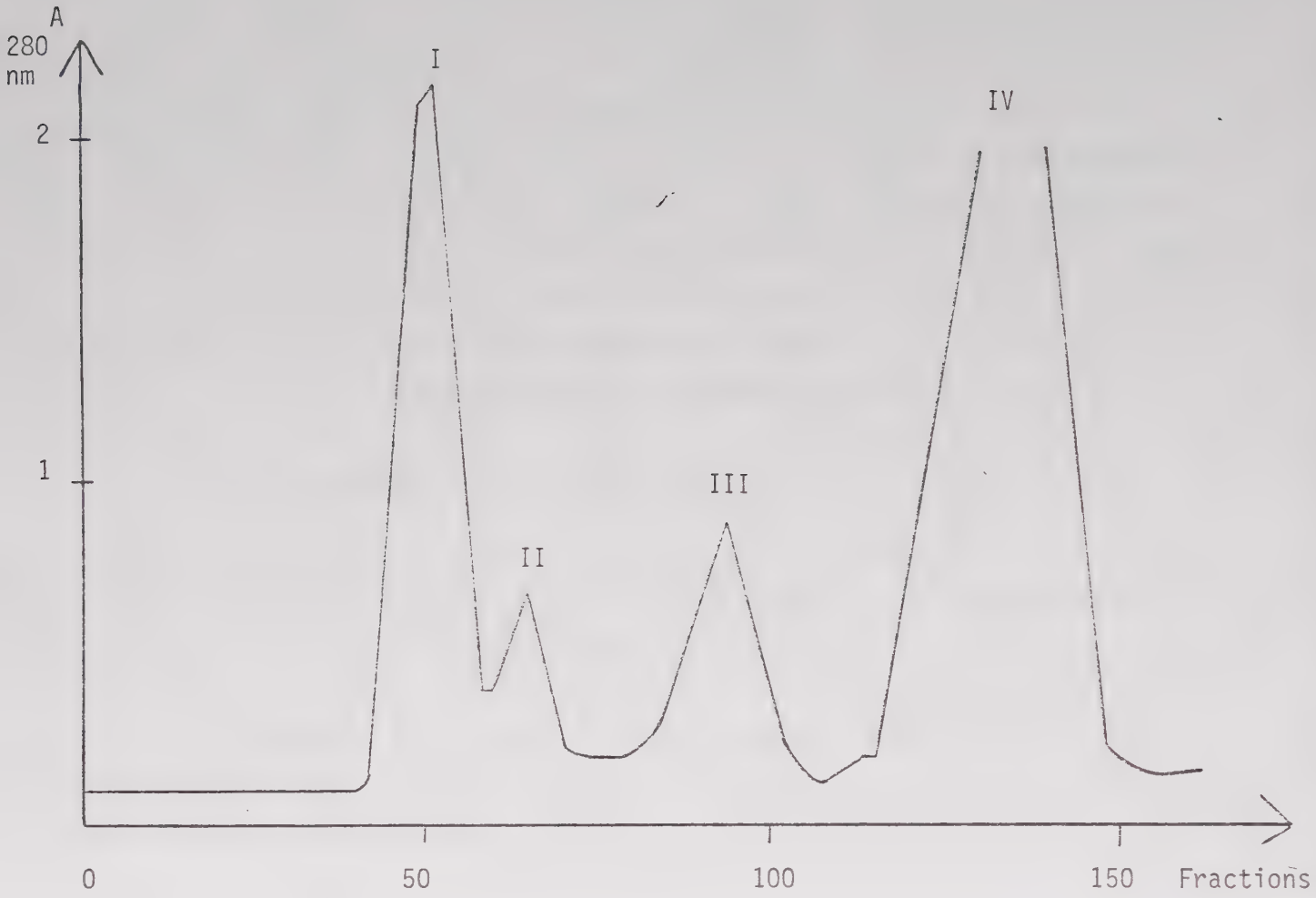


Figure 11 .Chromatographie sur colonne de séphadex G 50 de l'hydrolysat CNBr de la fraction 3 du variant $\alpha_{s2}D$.

Produit de départ : 500 mg de fraction 3.

Colonne : h : 180 cm ; Ø : 2,5 cm. Tampon acide acétique 30 %, urée 3,3 M, Nacl 0,5 M. Elution : 30 ml/h. Fractions : 5 ml. Absorbance : λ : 280 nm.

Enchaînement : H.	CN4	-	CN2	-	CN5	-	CN1	-	CN3	OH
Nombre de résidus :	4		22		115		49		17	

Fraction I.: Elle contient un peptide impur, qui a été repurifié par filtration sur colonne d'ultrogel ACA 54 dans l'acide acétique 30 %. Ce peptide (Tableau 9) est visiblement l'homologue du peptide CN5 de la protéine de référence. On note toutefois, par rapport à la composition de ce dernier, des valeurs plus faibles au niveau des résidus Glx, Gly, Ile, et tout particulièrement Ser. Ce résultat recoupe les résultats d'analyse de la composition en acides aminés de la caséine de départ, et indique la présence d'une altération dans le peptide CN5 du variant α_{s2}-D.

La dégradation d'Edman manuelle, effectuée sur ce peptide a permis d'identifier les deux résidus N-terminaux, Ala et Ile.

Fraction II : Elle a d'abord été rechromatographiée sur colonne de Sephadex G 25 afin d'en éliminer les "sels" (urée et NaCl). Elle contient, à l'état pur,le peptide homologue de CN1 (résidus 142 à 190 dans la protéine de référence). La composition de ce peptide ne diffère de celle du peptide CN1 de référence qu'au niveau du nombre estimé de résidus lysyle (6 au lieu de 9).

Toutefois, les résultats de la dégradation d'Edman et ceux de l'action des carboxypeptidases A et B permettent de conclure que ce peptide comporte bien 9 résidus lysyle, et non pas 6 :

- la dégradation d'Edman, effectuée au séquenceur, a pu être étendue à la presque totalité du peptide (Figure 13). Les résultats confirment l'existence de 8 des 9 résidus lysyle.

- l'action conjuguée des carboxypeptidases A et B (0,05 µ M de peptide; pH 8,0 ; 2 µl CPA + 2 µ l CPB ; 24 heures ; température ambiante) donne les résultats suivants : Thr + Gln : non dosées ; Homoser : 1,02 ; Ala : 0,91 ; Val : 0,75; Leu : 1,00 ; Tyr : 1,43 ; Lys : 2,09 ; His : 0,61. Ces résultats prouvaient l'existence du 9ème résidu lysyle.

Fraction III : Elle contient deux peptides dont la composition en acides aminés est très voisine de celle des peptides CN2 (résidus 5 à 26) et CN3 (résidus 191 à 207) de la protéine de référence (Tableau 9). Ces peptides ont été aisément séparés sur colonne de Dowex AG 50 WX 2, le peptide CN2 étant élué en début de gradient, le peptide CN3 avec le tampon de pH 5,28.

Fraction IV : Elle contient essentiellement des sels, et vraisemblablement le peptide CN4, qui a été perdu (résidus 1 à 4). A noter que l'existence

..../...

Résidus d'acides aminés	Peptides CNBr de la caséine α_{s2} D (c)				Peptides CNBr de la caséine α_{s2} A (b)			
	CN1	CN2	CN3	CN5	CN1	CN2	CN3	CN5
Asx	2,87 (2)	1,06 (1)		12,04 (14)	2	1		14
Thr	4,01 (5)	0,95 (1)	0,95 (1)	5,85 (7)	5	1	1	7
Ser	2,25 (2)	3,68 (5)		5,59 (6)	2	5		10
Glx (a)	9,21 (10)	6,84 (7)	1,60 (1)	19,45 (20)	10	7	1	22
Pro	2,21 (1)		2,37 (3)	6,59 (6)	1		3	6
Gly				1,57 (1)				2
Ala	2,08 (2)			5,92 (6)	2			6
Cys/2				(d) (2)				2
Val	2,32 (2)	0,77 (1)	1,04 (2)	8,16 (9)	2	1	2	9
Met (b)	(1)	(1)		(1)	1	1		1
Ile	1,00 (1)	1,35 (2)	1,00 (2)	4,72 (5)	1	2	2	6
Leu	4,75 (5)		0,95 (1)	7,37 (7)	5		1	7
Tyr	2,33 (3)	0,54 (1)	1,32 (2)	4,33 (5)	3	1	2	6
Phe	2,73 (3)			2,83 (3)	3			3
Lys	5,76 (9)	2,36 (2)	3,18 (3)	9,33 (9)	9	2	3	9
His	0,98 (1)	0,75 (1)		1,59 (1)	1	1		1
Arg	1,78 (2)		0,69 (1)	3,04 (3)	2		1	3
Trp			(e) (1)	(e) (1)			1	1
P	(f) (1)	3,87 (4)		(f) (3)	+	+		+
Nombre total de résidus	49	22	17	105	49	22	17	115

Tableau 9. Composition en acides aminés des peptides CNBr du variant α_{s2}D (fraction 3). Entre parenthèses : valeurs exactes.

(a) Présence de Glx + homosérine. (b) La méthionine est sous forme d'homosérine-homosérine lactone dans les peptides CNBr. (c) Le peptide CN4 a été perdu. (d) Les 2 cystéines sont données dans un peptide trypsique (cf. figure 11). (e) Le Trp a été coloré par le réactif d'EHRLICH dans des peptides trypsiques (cf. figure 11). (f) Mise en évidence par hydrolyse ménagée et par dosage colorimétrique dans des peptides trypsiques.

de ce peptide dans le variant α_{s2}-D, est confirmée par les résultats de la dégradation d'Edman (cf. ci-dessus).

3-4.2. Recherche et dosage du phosphore.

La caséine α_{s2} de référence comporte des groupements phosphate dans les peptides CN1, CN2 et CN5. A ce stade du travail, une recherche sur les groupements phosphate a été entreprise sur les peptides CN1 et CN2 du variant α_{s2}-D (fraction 3), et non sur le peptide CN5 (au moment des investigations sur CN1 et CN2, le peptide CN5 n'avait pas encore été purifié). Les observations suivantes ont été faites :

CN1 : L'hydrolyse ménagée a confirmé la présence de phosphosérine, correspondant au résidu 143 de la séquence de référence.

CN2 : Le dosage effectué sur ce peptide a donné la valeur de 3,87, soit 4 phosphores par mole de peptide, valeur identique à celle du peptide de référence.

Ces résultats, ajoutés à ceux de l'analyse de la composition en acides aminés des peptides CNBr conduisaient à rechercher l'altération spécifique du variant α_{s2}-D dans le peptide CN5.

3-5. Structure du peptide CN5 contenant l'altération spécifique du variant α_{s2}-D.

3-5.1. Préparation spécifique du peptide CN5.

L'étude détaillée du peptide CN5 exigeait la préparation d'une quantité suffisante de produit de départ. A ce stade du travail,il a été fait appel à une méthode, voisine de celle utilisée par BRIGNON (1979) et qui se base sur l'observation suivante : le peptide CN5 de la caséine α_{s2}D est insoluble, et précipite, dans l'acide formique 70 % ; il peut être séparé du surnageant, contenant les autres peptides CNBr par simple centrifugation. On dispose ainsi d'un procédé très simple de séparation du peptide CN5.

En conséquence, 500 mg de caséine α_{s2}-D (fraction 3) réduite et alkylée ont été hydrolysés par le bromure de cyanogène dans une solution d'acide formique 70 % pendant 24 heures. Le précipité ainsi obtenu a été récolté après centrifugation.

. . . . . .

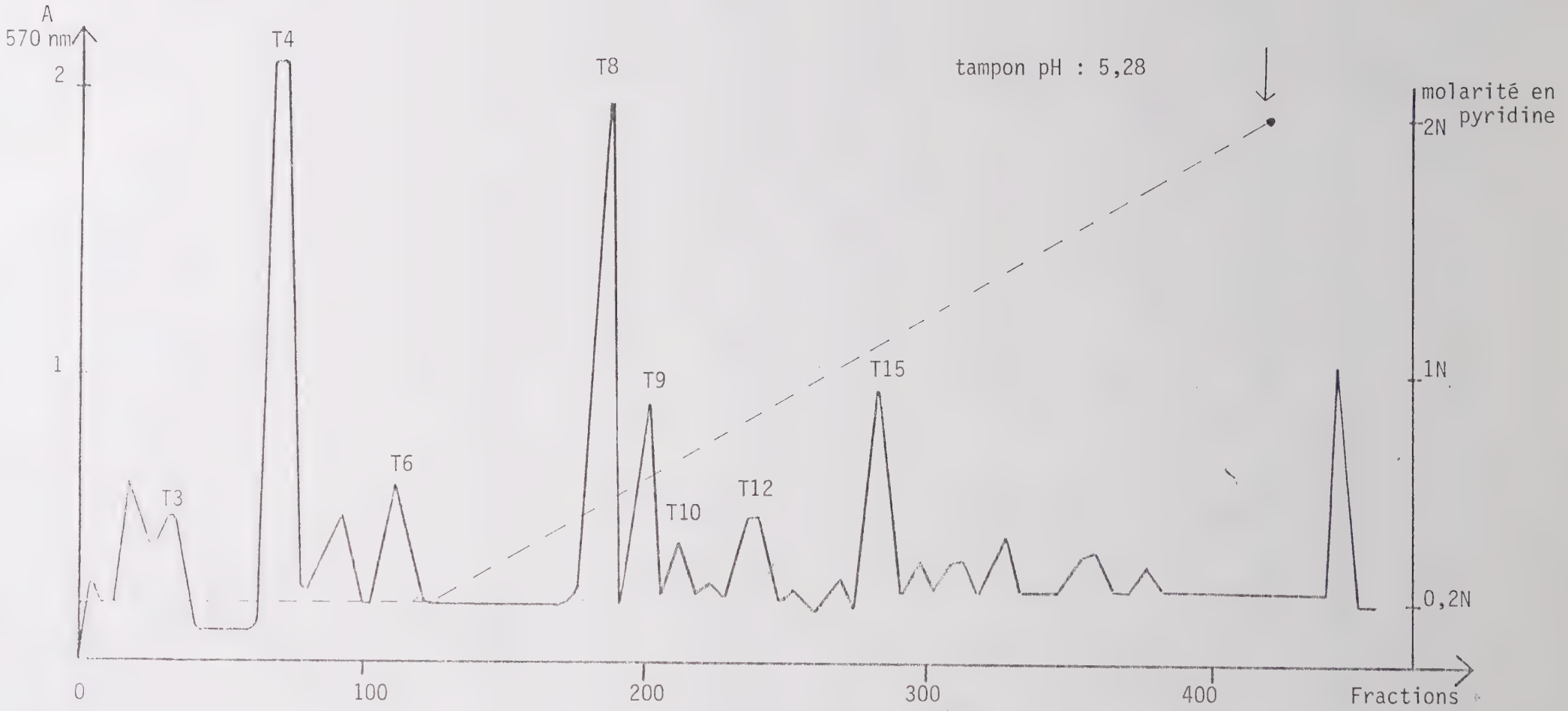


Figure 12 . Chromatographie sur colonne de DOWEX AG 50 WX2 de l'hydrolysat trypsique du peptide CN5 du variant α_{s2}D (fraction 3). Ce peptide CN5 forme la majeure partie des constituants du "précipité" obtenu par action du bromure de cyanogène.

Colonne : h : 120 cm ; Ø : 2 cm. Tampon pyridine-acide acétique (pH 3,1). Température : 40°C. Elution : 10 ml/h. Gradient linéaire en normalité de pyridine (1 l de tampon pH 3,1 ; 1 l de tampon pH 5,0). Fractions : 7 ml. Hydrolyse alcaline et réaction à la ninhydrine. Absorbance : λ : 570 nm.

3-5.2. Hydrolyse trypsique de CN5, et purification des peptides.

Le précipité précédent a été redissout dans le tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M et soumis à l'action de la trypsine (E/S : 1/100 ; 3 heures; 37°C). L'hydrolysat ainsi obtenu a été évaporé à sec et redissous dans le tampon pyridine-acide acétique de pH 3,1. Il a ensuite été chromatographié sur colonne de Dowex AG 50 WX2. La Figure 12 reproduit le chromatogramme obtenu.

L'analyse des diverses fractions du chromatogramme a permis d'identifier certains peptides à l'état pur. D'autres ont dû être repurifiés sur colonne de Sephadex G 25 en acide acétique 30 %, ou encore par électrophorèse ou chromatographie sur papier.

Le Tableau 10 donne la composition des peptides trypsiques obtenus. A l'exception du peptide CN5T4b2, tous ces peptides ont des compositions identiques à celles de peptides trypsiques du peptide CN5 de la protéine de référence. Ils ont été reportés sur la Figure 13 (segments fléchés).

Le peptide CN5T4b2 provient du 4ème pic de la chromatographie sur colonne de Dowex ; il a été repurifié sur colonne de Sephadex G 25 en acide acétique 30 %, puis par électrophorèse préparative sur papier (pH 1,9 ; 3 000 v ; 1/2 heure).

La séquence de ce peptide, déterminée par dégradation manuelle d'Edman est la suivante :

46

- Asn-Ala-Asn-Glu-Glu-Glu-Ser-Ala-Glu-Val-Ala-Thr-Glu-Glu-Val-Lys-

P

La présence d'un résidu phosphoséryle dans ce peptide a été établie par hydrolyse ménagée.

L'analyse de l'ensemble des résultats obtenus permet de constater l'absence dans le variant α_{s2}D,d'un peptide ayant la composition du peptide CN5T1 de la protéine de référence, peptide qui correspond aux résidus 46 à 70 de sa chaîne polypeptidique. Par contre, on observe la présence du peptide CN5T4b2 qui n'a pas d'équivalent dans la protéine de référence. Toutefois, il est visible que la séquence des acides aminés de ce peptide,qui est donnée ci-dessus,est celle du peptide CN5T1 de la protéine de référence, amputé d'un élément de séquence de 9 résidus d'acides aminés compris entre les résidus 51 et 60 (Tableau 10).

. . . / . . .

Résidus d'acides aminés	CN5T3	CN5T4b2	CN5T6	CN5T8	CN5T9	CN5T10	CN5T12a	CN5T12b	CN5T15a	CN5T15b
Asx	1,09 (1)	1,88 (2)	1,04 (1)	1,98 (2)	2,00 (2)	1,00 (1)	1,96 (2)	2,03 (2)		2,00 (2)
Thr	1,00 (1)	1,13 (1)	0,96 (1)		1,93 (2)	0,71 (1)	0,88 (1)			1,00 (1)
Ser	2,17 (3)	1,03 (1)	2,32 (3)			0,71 (1)				
Glx	3,76 (4)	5,70 (6)	3,99 (4)	3,78 (4)		0,85 (1)		3,06 (3)	1,06 (1)	1,26 (1)
Pro				2,76 (3)	1,97 (2)					
Gly				1,21 (1)						
Ala		2,33 (3)			1,00 (1)			0,96 (1)		
Cys 1/2						1,03 (2)				
Val		1,63 (2)		1,62 (2)	1,00 (1)		0,92 (1)		1,47 (2)	0,93 (1)
Met										
Ile				0,82 (1)	1,00 (1)		0,88 (1)	0,93 (1)		0,88 (1)
Leu	0,85 (1)		0,98 (1)	2,72 (3)	1,07 (1)	1,17 (1)		1,03 (1)		
Tyr				2,20 (3)				0,41 (1)		0,33 (1)
Phe				0,84 (1)		0,95 (1)		1,03 (1)		
Lys	0,95 (1)	0,93 (1)	1,95 (2)	0,96 (1)		0,98 (1)	1,00 (1)	1,55 (1)		1,73 (2)
His										0,55 (1)
Arg					0,98 (1)				1,00 (1)	
Trp				.... (1)*						
P	1,96 (2)	(1)**								

Tableau 10. Compositions en acides aminés des peptides trypsiques de CN5 de la caséine α_{s2}D (fraction 3). Les analyses ont été effectuées a partir d'hydrolysats de 24 heures ; les valeurs sont données en Moles d'acides aminés par Mole de peptides. Entre parenthèses : valeurs exactes.

* Le tryptophane a été caractérisé par le réactif d'EHRLICH. ** Mise en évidence par hydrolyse ménagée de la phosphosérine.

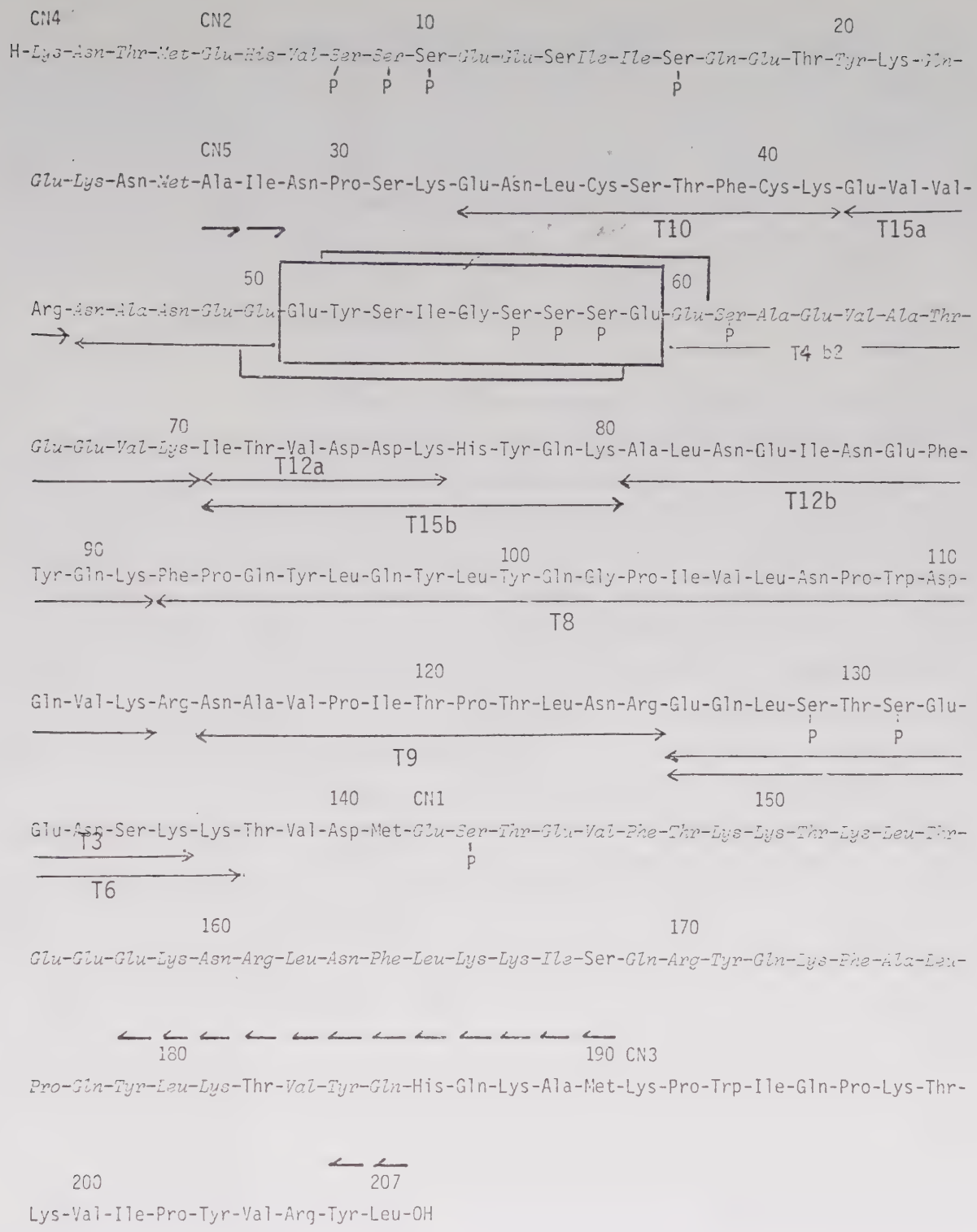


Figure 13. Localisation de la délétion différenciant le variant α_{s2}-CnD du variant de référence α_{s2}-CnA.

La séquence du variant α_{s2}-CnA est celle donnée par BRIGNON et al. (1977). La délétion du variant α_{s2}-CnD est encadrée, avec ses 3 alternatives possibles. La désignation des peptides CNBrfigure au-dessus de leur résidu N-terminal. En italiques : éléments de séquence établis à l'aide du séquenceur, ou (peptide T4b2) par dégradation manuelle d'Edman ; ⟷ , sous un élément de séquence: peptide trypsique ; ⟵ ,acide aminé libéré à partir de la caséine et de CN1 par les carboxypeptidases A ou B ; ⟶ , résidus identifiés, sur CN5, par la méthode d'Edman manuelle.

Compte-tenu des particularités de la séquence de la caséine α_{s2} dans cette région, il y a incertitude sur les limites exactes, au niveau de l'ADN, de la délétion observée ; elle peut correspondre au segment d'ADN codant l'un des trois éléments de séquence suivants : résidus 50 à 58, ou 51 à 59, ou 52 à 60. En effet chacune de ces trois délétions laisse, au niveau de la protéine, une séquence identique.

3-5.3. Conclusions.

La délétion d'un élément de séquence comportant notamment 2 résidus Glu et 3 résidus PSer permet d'expliquer parfaitement la différence de mobilité entre le type de référence de la caséine α_{s2} (variant $\alpha_{s2}A$) et le variant $\alpha_{s2}D$. D'autre part, le peptide délété ne comporte pas de site de phosphorylation différentielle (BRIGNON et al., 1979), et représente donc bien un élément de séquence commun aux diverses fractions électrophorétiques de la caséine α_{s2}. Ceci rend bien compte du fait que, dans le variant $\alpha_{s2}D$, la mobilité de toutes les bandes paraît être affectée de la même manière,et qu'en conséquence, l'aspect général de ce variant en électrophorèse est - au décalage près- celui de la protéine de référence.

Aucune autre différence n'ayant été décelée au cours de l'analyse biochimique du variant $\alpha_{s2}D$, on peut conclure que ce variant diffère, de la protéine de référence, par la délétion d'un élément de séquence de 9 résidus (50 à 58, ou 51 à 59 ou 52 à 60).

VI. CARACTERISATION DU VARIANT $\alpha_{s2}C$.

1. Ligne directrice d'étude du variant.

Comme il a déjà été vu plus haut (voir ci-contre le rappel de la Figure 3) le variant $\alpha_{s2}C$, découvert chez des yaks népalais et mongols, se caractérise en gel alcalin par un patron électrophorétique différent de celui de la caséine α_{s2} de référence (variant $\alpha_{s2}A$), et différent également de celui du variant $\alpha_{s2}D$: par rapport à celui de la protéine de référence, le patron du variant $\alpha_{s2}C$ se caractérise surtout par une bande lente intense (L). Cette bande est séparée d'une bande rapide (R), migrant entre les bandes 3 et 4 de la protéine de référence, par une distance correspondant à priori, à une différence de 4 à 5 charges. Entre les bandes R et L existe un doublet de bandes fines (d).

. . . / . . .

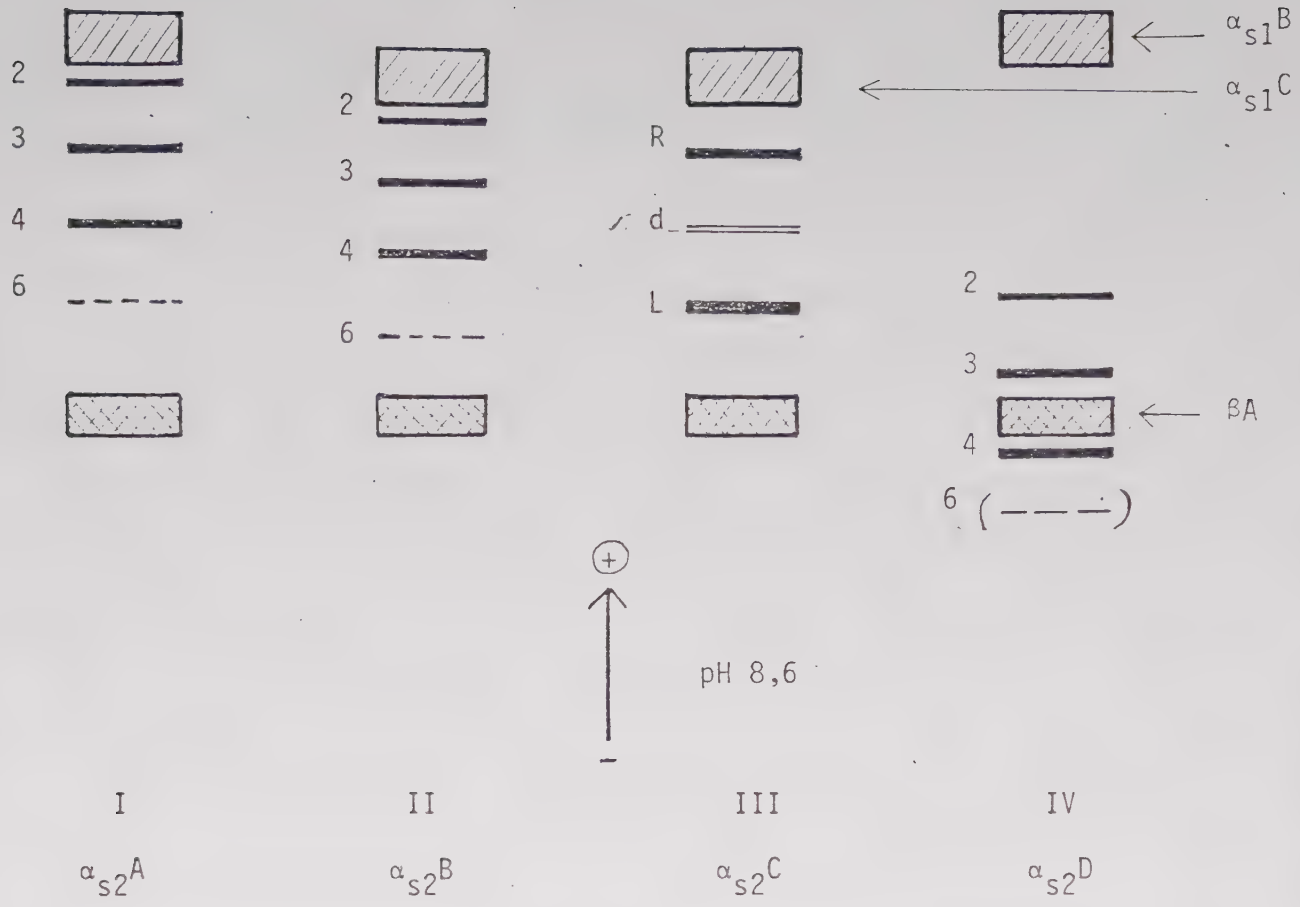


Figure 3. Représentation schématique des variants électrophorétiques de la caséine α_{s2} dans le genre Bos.

Electrophorèse en gel d'amidon avec urée et β-mercaptoéthanol (pH 8,6). Les variants $\alpha_{s2}A$, $\alpha_{s2}B$, $\alpha_{s2}D$ comportent 4 bandes numérotées 2, 3, 4 et 6 selon la nomenclature d'ANNAN et MANSON (1969). La bande 6 du variant $\alpha_{s2}D$ est représentée entre parenthèse car migrant dans la zone de bandes de caséine κ, elle n'a pas, en fait, été identifiée au cours de cette étude.

Le variant $\alpha_{s2}C$ comporte 2 bandes principales, L et R, et un doublet, d. A noter que les variants $\alpha_{s2}B$ et $\alpha_{s2}C$ sont toujours associés au variant $\alpha_{s1}C$.

Une analyse préliminaire de la fraction L purifiée approximativement par chromatographie sur DEAE Cellulose avait permis à GROSCLAUDE et al. (1976 b) de conclure ce qui suit : "sa composition en acides aminés est très voisine de celle du variant de référence α_{s2}-CnA, dont elle a la séquence N-terminale ; par contre sa teneur en phosphore est plus faible que celle de la fraction la plus lente (bande 6) d' α_{s2}-CnA". Il est à noter que cette observation sur la plus faible teneur en phosphore de la bande L concorde avec le fait qu'en électrophorèse à pH 3,0, le variant α_{s2}C migre en avant de la caséine α_{s2}A de référence.

GROSCLAUDE et al. (1976 b) avaient par ailleurs interprété la différence de patron électrophorétique du variant α_{s2}C en suggérant que la mutation spécifique de ce variant affectait "un site responsable de l'hétérogénéité observée dans le nombre et la localisation des groupements phosphates des diverses fractions", autrement dit un site de "phosphorylation différentielle" de la caséine α_{s2}.

L'hypothèse de travail qui a servi de ligne directrice à l'étude du variant α_{s2}C a donc été de supposer que l'altération spécifique du variant α_{s2}C affectait un site de phosphorylation différentielle de la caséine α_{s2}.

La recherche des sites de phosphorylation différentielle de la caséine α_{s2} de référence effectuée par BRIGNON (1979) avait conduit à identifier 3 sites localisés dans deux peptides CNBr différents :

Ser 8, dans le peptide CN2

Ser 31 et Thr 66, dans le peptide CN5.

Comme celle du variant α_{s2}D, l'analyse biochimique du variant α_{s2}C est plus particulièrement orientée vers l'étude des phosphopeptides, mais y compris, cette fois, ceux comportant des sites de phosphorylation différentielle.En tout état de cause, il était nécessaire de procéder à une analyse comparée des bandes L et R, de manière à parvenir à des conclusions suffisamment bien établies.

2. Préparation de la fraction lente L.

2.1. Séparation du complexe des caséines α_{s1}, α_{s2} et κ à partir de la caséine entière.

Une quantité de 23 g de caséine entière lyophilisée a été soumise au fractionnement chimique selon la technique de THOMPSON.et KIDDY (1964) en milieu urée

..../...

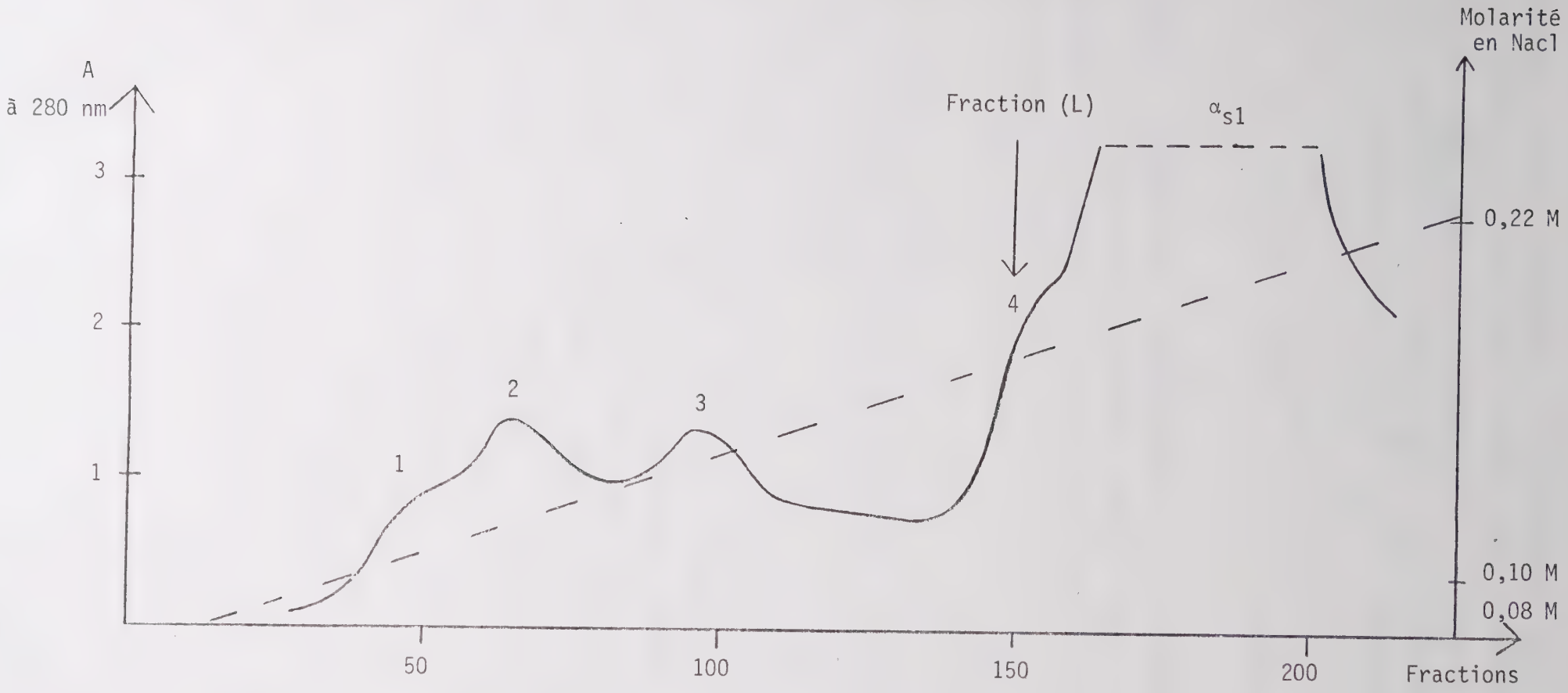


Figure 14 . Chromatographie, sur colonne de DEAE cellulose, du complexe des caséines α_{s1}, α_{s2}C et κ .
Produit de départ : 5 g de complexe, obtenu par la méthode de THOMPSON et KIDDY (1964).
Colonne : h : 15 cm ; Ø : 6 cm. Tampon imidazole 0,02 M, urée 3,3 M, β -mercaptoéthanol 0,3 %, pH 7,0.
Température ambiante. Elution : 100 ml/h ; gradient linéaire en molarité de NaCl (0,08 M à 0,22 M).
Fractions : 10 ml. Rendement : 250 mg de fraction L.

3,3 M à pH 4,7. Le précipité obtenu est constitué essentiellement des caséines α_{s1}, α_{s2} et κ, la caséine β se trouvant dans le surnageant. A ce stade il n'a pas paru nécessaire de poursuivre l'opération de fractionnement chimique permettant d'isoler le complexe de caséines α_{s2} et κ, car la fraction L pouvait être séparée sur colonne de DEAE cellulose, directement à partir du mélange α_{s1}, α_{s2} et κ. Le précipité a donc été dialysé contre l'eau distillée et lyophilisé (quantité obtenue : 11,5 g).

2.2. Chromatographie du complexe α_{s1}, α_{s2} et κ sur colonne de DEAE cellulose.

Deux chromatographies successives ont été effectuées sur colonne de DEAE cellulose microgranulaire, à partir de 5 g, puis de 6,5 g du complexe obtenu ci-dessus. Après fixation des caséines sur la colonne, selon la technique décrite pour le variant α_{s2}D, l'élution s'est effectuée en tampon urée 3,3 M, imidazole 0,02 M, β-mercaptoéthanol 0,3 %, à pH 7,0, avec un gradient linéaire en molarité de NaCl (de 0,08 M, à 0,22 M) (Figure 14). Après dialyse et lyophilisation, les différentes fractions ont été analysées par électrophorèse en gel d'amidon avec urée et β-mercaptoéthanol à pH 8,6. La fraction 4 a fourni la fraction L du variant α_{s2}C dans un état de pureté satisfaisant.

3. Analyse biochimique de la fraction L.

3.1. Composition en acides aminés.

Des hydrolyses acides ont été effectuées sur des aliquotes de 0,01 µMole de la fraction L purifiée, pendant des durées de 24, 48 et 96 heures. Le nombre de résidus d'acides aminés a été estimé sur la base de valeurs moyennes et corrigées (Tableau 11). Par rapport à la composition du variant de référence (α_{s2}A), des valeurs plus élevées sont obtenues pour les résidus Gly, Leu et His ; par contre, comme dans le cas du variant α_{s2}D, la valeur obtenue pour les résidus Lys est faible (22 au lieu de 24).

3.2. Dosage du phosphore.

Le dosage colorimétrique effectué selon la méthode de BAMAN et NOVOTNY (1948) donne la valeur de 9 (Tableau 11), supérieure à la première estimation (8) de GROSCLAUDE et al. (1976 b), mais toujours inférieure à la valeur de 10 trouvée par [illegible] de la protéine de référence.

... ...

Résidus d'acides aminés	Caséine $\alpha_{s2}C$ (L)	Caséine $\alpha_{s2}A$
Asx	18,32	18
Thr	13,50	15
Ser	16,10	17
Glx	39,46	40
Pro	10,69	10
Gly	4,81	2
Ala	8,07	8
Cys 1/2	a	2
Val	13,80	14
Met	3,49	4
Ile	11,23	11
Leu	14,90	13
Tyr	10,16	12
Phe	7,03	6
His	4,03	3
Lys	21,80	24
Arg	6,00	6
Trp	b	2
P	8,99	(10,11,12 ou 13)

Tableau 11. Composition en acides aminés et phosphore du variant $\alpha_{s2}C$ (fraction L).

a : dosage effectué dans le peptide trypsique contenant ces 2 cystéines.

b : coloration d'EHRLICH sur les peptides CNBr.

Les valeurs données pour $\alpha_{s2}C$ (L) sont établies à partir d'hydrolysats de 24, 48 et 96 heures.

3.3. Etude des peptides CNBr de la fraction L.

3.3.1. Séparation des peptides CNBr.

Une quantité de 550 mg de la fraction L a été hydrolysée par le bromure de cyanogène dans l'acide formique 70 %, puis réduite et alkylée en présence de β-mercaptoéthanol et d'acide iodacétique. Les peptides ainsi obtenus, desséchés à l'évaporateur rotatif, ont été resolubilisés dans un volume minimum de tampon acide acétique 30 %, urée 3,3 M, avant d'être chromatographiés sur colonne de Sephadex G 50 fine dans le même tampon (Figure 15). Chaque fraction obtenue a ensuite été "dessalée" par filtration sur une colonne de Sephadex G 25 en acide formique 30 % (hauteur : 60 cm ; diamètre 3 cm).

L'examen d'une aliquote de ces fractions par électrophorèse sur papier à pH 1,9 a montré que la fraction 1 contenait le peptide CN5, la fraction 2 le peptide CN1, et la fraction 3 les peptides CN2 et CN3, la désignation de ces peptides se faisant toujours par homologie avec ceux de la protéine de référence. Les peptides CN2 et CN3 ont été ensuite facilement séparés sur colonne de Dowex AG 50 WX2. Le peptide CN4, élué avec les sels,n'a pas été retrouvé.

3.3.2. Composition en acides aminés des peptides CNBr.

Les compositions en acides aminés des peptides CN1, CN2, CN3 et CN5 ont été établies à partir des produits d'hydrolyse de 24, 48 et 96 heures. Elles sont assez voisines de celles des peptides homologues de la protéine de référence (variant α_{s2}A) ou du variant α_{s2}D, à l'exception toutefois, et évidemment pour ce dernier, du peptide contenant la délétion (Tableau 12). En ce qui concerne le tétrapeptide CN4 manquant, son existence est confirmée par les résultats de la dégradation d'Edman qui avait été entreprise au cours de l'étude préliminaire (GROSCLAUDE et al., 1976 b) déjà citée en 5.1.

L'examen du Tableau 12 permet de conclure que la différence la plus significative est certainement la valeur plus élevée pour le résidu Gly dans le peptide CN5 du variant α_{s2}C ; il semble également que le nombre de résidus Glx dans ce peptide soit plus faible. La signification des autres différences est plus difficile à interpréter.

3.3.3. Dosage du phosphore dans les peptides CNBr.

Le dosage du phosphore a été effectué sur les peptides CN1, CN2 et CN5 de la fraction L, qui renferment des phosphoaminoacides. Les résultats obtenus sont les suivants :

. . . / . . .

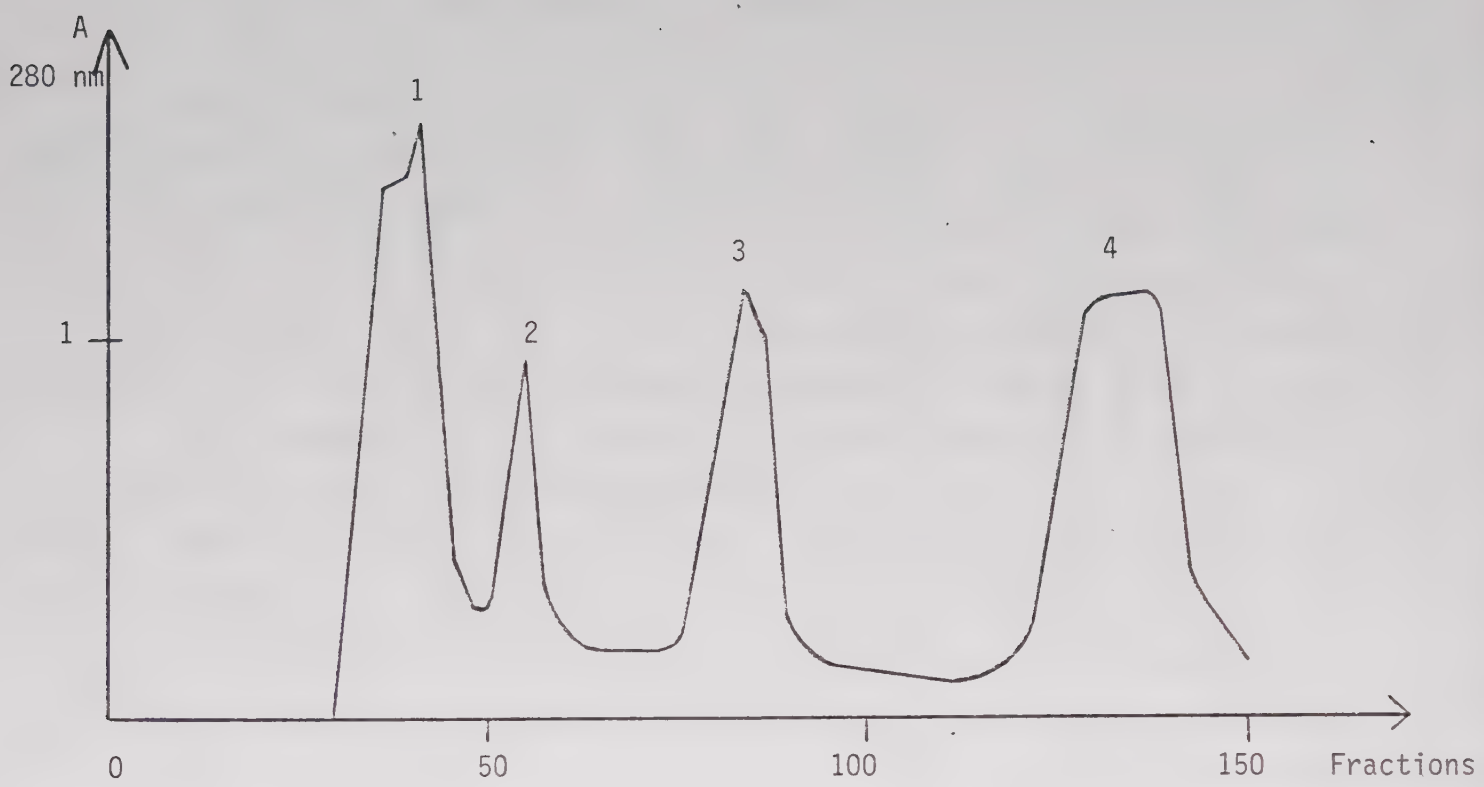


Figure 15 . Chromatographie sur colonne de Sephadex G 50 fine de l'hydrolysat CNBr de la caséine α_{s2}C (fraction L).
Colonne : h : 160 cm ; Ø : 2,5 cm. Tampon acide acétique 30 %, urée 3,3 M. Fractions : 5 ml. Elution : 30 ml/h. Absorbance : λ : 280 nm.

Résidus d'acides aminés	CN1 α_{s2}C (L)	CN1 α_{s2}A	CN2 α_{s2}C (L)	CN3 α_{s2}C (L)	CN5 α_{s2}C (L)	CN5 α_{s2}A
Asx	2,87	2,20 (2)	1,14 (1)		13,14	13,32 (14)
Thr	3,60	4,51 (5)	0,95 (1)	0,96 (1)	7,30	7,02 (7)
Ser	2,47	1,37 (2)	4,40 (5)		9,26	9,03 (10)
Glx (a)	10,24	10,46 (10)	7,71 (7)	0,96 (1)	20,69	25,58 (22)
Pro	2,24	1,14 (1)		3,30 (3)	6,08	5,32 (6)
Gly					3,46	2,11 (2)
Ala	2,04	1,90 (2)			5,55	5,74 (6)
Cys 1/2					(c)	
Val	2,11	2,01 (2)	1,00 (1)	1,77 (2)	8,68	8,88 (9)
Met (b)		(1)	(1)			(1)
Ile	1,25	1,06 (1)	1,80 (2)	1,79 (2)	5,71	6,38 (6)
Leu	5,07	5,00 (5)		1,08 (1)	7,83	6,97 (7)
Tyr	2,20	2,44 (3)	0,69 (1)	1,63 (2)	5,02	6,51 (6)
Phe	2,66	2,84 (3)			3,42	2,95 (3)
His	1,03	0,86 (1)	0,90 (1)		1,51	1,54 (1)
Lys	8,00	8,81 (9)	1,98 (2)	3,22 (3)	9,26	10,22 (9)
Arg	1,98	2,07 (2)		1,09 (1)	3,22	2,86 (3)
Trp				(d) (1)	(d)	(1)
P	0,89	+	3,89		4,11	+
Nombre de résidus		(49)	(22)	(17)		(115)

Tableau 12. Composition en acides aminés et phosphore des peptides CNBr de la caséine α_{s2}C (fraction L). Les compositions en acides aminés ont été obtenues à partir d'hydrolysats de 24, 48 et 96 heures. Les compositions des peptides CN1 et CN5 de la protéine de référence (variant α_{s2}A) sont données à côté de celles des peptides homologues du variant α_{s2}C (L). Entre parenthèses : valeurs exactes pour les protéines de référence (BRIGNON et al., 1976).

a) Glx + Homosérine - b) Met existe sous forme d'homosérine lactone - c) Les 2 cystéines ont été dosées dans le peptide trypsique CN5T6b - d) Non dosé, mais révélé par coloration spécifique d'EHRLICH dans les peptides CNBr.

CN1 : 0,89 P/Mole comme dans le peptide CN1 de la protéine de référence.

CN2 : 3,89 P/Mole, comme dans le peptide CN2 des fractions 2 et 3 de la protéine de référence.

CN5 : 4,11 P/Mole, contre 6 au minimum dans le peptide homologue de la protéine de référence.

Ces résultats conduisaient à rechercher l'altération spécifique de variant $\alpha_{S2}C$, fraction L, dans le peptide CN5, au niveau notamment des hydroxyaminoacides et des résidus glycyle.

3.4. Préparation et analyse des peptides trypsiques de CN5.

3.4.1. Obtention et séparation des peptides.

Une quantité de 3 µ Moles du peptide CN5 a été soumise à l'hydrolyse trypsique dans un tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M à pH 7,8 (E/S : 1/50 ; 2 heures 30 ; 37°C). L'hydrolysat ainsi obtenu a été chromatographié sur une colonne de Dowex AG 50 WX2 équilibrée en tampon pyridine-acide acétique de pH 3,1, avec élution des peptides par un gradient de molarité en pyridine (de pH 3,1 à 5,0) (Figure 16).

3.4.2. Identification et analyse des peptides.

Compte-tenu des résultats obtenus précédemment, les travaux ont été orientés en priorité vers la recherche et l'étude des peptides homologues des phosphopeptides de la protéine de référence ; en l'occurence, 3 peptides, comportant respectivement les résidus 27 à 32, 46 à 70 et 126 à 136. Ces peptides ont été retrouvés dans les fractions T1, T5 et T7 (Figure 16).

a) Fraction T1. Cette fraction contient le peptide CN5T1 homologue du peptide CN5T1 de la protéine de référence (BRIGNON, 1979). La teneur de ce peptide en résidus glycyle (1) est inchangée (Tableau 13).

b) Fraction T5. Cette fraction contient un mélange de peptides, CN5T5, dont la composition en acides aminés suggère qu'il s'agit des homologues, dans la protéine de référence, des peptides CN5T2 (résidus 126 à 136) et CN5T6 (115 à 125). Pour confirmer cette hypothèse, une analyse a été effectuée au spectromètre de masse sur le mélange CN5T5. Cette analyse a permis d'identifier les séquences N-terminales suivantes :

Glu-Gln-Leu-Ser-

et Asn-Ala-Val-Pro-Ile-Thr-

.../...

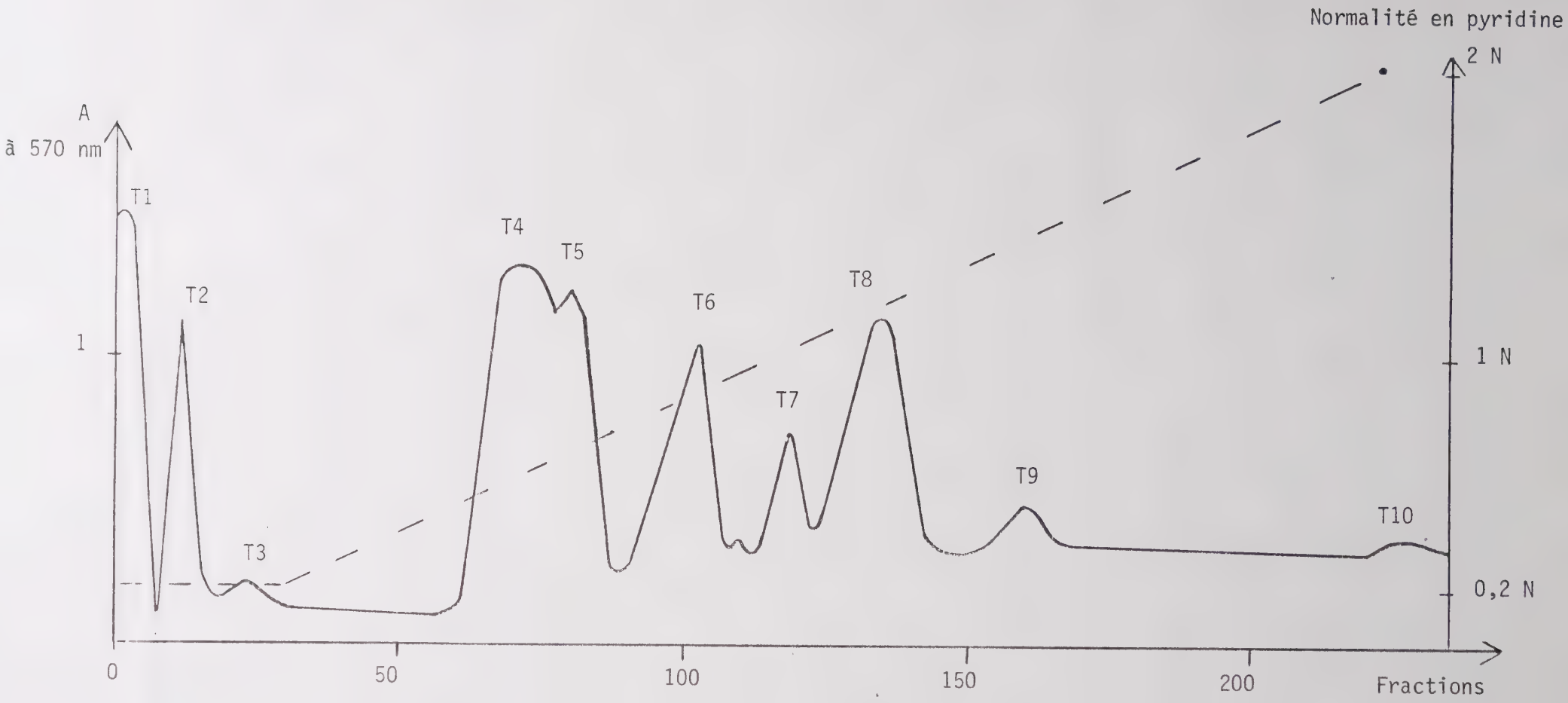


Figure 16 . Chromatographie, sur colonne de DOWEX AG 50 WX 2 de l'hydrolysat trypsique du peptide CN5 du variant $\alpha_{s2}C$ (Fraction L).

Colonne : h : 15 cm ; Ø : 1 cm. Tampon pyridine-acide acétique (pH 3,1). Température : 40°C. Elution : 35 ml/h. Gradient linéaire en molarité de pyridine (350 ml de tampon pH 3,1 ; 350 ml de tampon pH 5,0). Fractions : 3,5 ml. Hydrolyse alcaline et réaction à la ninhydrine. Absorbance : λ : 570 nm.

Ces séquences sont bien identiques aux séquences N-terminales des peptides CN5T2 et CN5T6 de la protéine de référence. Toutefois le résidu séryle 129, phosphorylé dans la protéine de référence, ne l'est pas ici, dans la fraction lente du variant $\alpha_{s2}C$.

Une hydrolyse ménagée a été effectuée sur le mélange CN5T5 (0,1 µM ; HCl 5,7 N ; 4 heures 30 ; 110°C). L'électrophorèse sur papier, à pH 1,9 de l'hydrolysat, en présence de témoin SerP et ThrP révèle l'absence complète de phosphoaminoacides dans le mélange. Pas plus que le résidu Ser 129, le résidu Ser 131 n'est donc phosphorylé.

Les composants du mélange CN5T5 ont été purifiés en petite quantité, par électrophorèse sur papier à pH 6,5 (3 000 v ; 30 min.). La composition en acides aminés des peptides ainsi obtenus, CN5T5a et CN5T5b (Tableau 13) est bien identique à celle des peptides CN5T3 et CN5T6 de la protéine de référence (BRIGNON, 1979), à la substitution Thr → Ile près.

Pour vérifier la séquence des acides aminés du peptide CN5T5b le reste de la fraction CN5T5 disponible, soit 5 µ Moles, a été hydrolysé par la thermolysine (E/S : 1/200 ; 1 heure ; 37°C). L'hydrolysat ainsi obtenu a été chromatographié sur colonne de Sephadex G 10, en acide acétique 30 %. La seconde fraction de l'éluat a fourni un peptide CN5T5Th2, assez impur, mais de composition probable Asx, Ser, Glx_2, Ile, Lys. La séquence de cet heptapeptide a pu, malgré son impureté, être établie sans ambiguité par dégradation manuelle d'Edman (⟶) pour les 5 premiers résidus, et action des carboxypeptidases A et B (⟵) pour les deux derniers :

CN5T5Th2 : Ile-Ser-Glu-Glu-Asn-Ser-Lys-

En définitive la structure du peptide CN5T5b issu de la fraction L du variant $\alpha_{s2}C$ est la suivante :

126 136
Glu-Gln-Leu-Ser-Ile-Ser-Glu-Glu-Asn-Ser-Lys-

Ce peptide diffère donc de son homologue de la protéine de référence par :

. la substitution 130 Thr → Ile
.. la perte des deux groupements phosphate des résidus 129 Ser et 131 Ser.

. . . / . . .

Résidus d'acides aminés	CN5T1	CN5T5	CN5T5 a	CN5T5 b	CN5T6 b	CN5T7
Asx	2,11 (2)	2,73 (3)	2,00 (2)	1,07 (1)	1,00 (1)	1,17 (1)
Thr	1,96 (1)	1,80 (2)	1,85 (2)	-	0,98 (1)	
Ser	4,07 (5)	2,32 (3)		2,55 (3)	0,98 (1)	0,98 (1)
Glx	7,77 (8)	3,59 (4)		3,86 (4)		
Pro		1,85 (2)	1,93 (2)			1,05 (1)
Gly	1,03 (1)				1,00 (1)	
Ala	1,85 (3)	1,00 (1)	0,97 (1)			0,98 (1)
1/2Cys					1,21 (2)	
Val	1,96 (2)	1,09 (1)	1,00 (1)			
Met						
Ile	1,00 (1)	1,73 (2)	1,00 (1)	0,92 (1)		0,96 (1)
Leu		2,09 (2)	1,11 (1)	1,02 (1)	1,00 (1)	
Tyr	1,02 (1)					
Phe					0,71 (1)	
His						
Lys	0,81 (1)	1,15 (1)		1,02 (1)	0,91 (1)	1,11 (1)
Arg		1,09 (1)	1,00 (1)			
Trp						
P						

Tableau 13 . Composition en acides aminés des peptides trypsiques de CN5 (variant α_{s2}C, fraction L), étudiés plus en détail dans ce travail. Analyses effectuées à partir d'hydrolysats de 24 heures. Entre parenthèses : valeurs entières réelles.

Ce résultat rend bien compte du fait que le peptide CN5T5b est élué de la colonne de Dowex à un stade plus avancé du gradient que son homologue CN5T2 de la protéine de référence.

c) Fraction T6. Après repurification par électrophorèse sur papier à pH 1,9, cette fraction a fourni le peptide CN5T6b qui ne peut correspondre qu'à l'élément de séquence 33 à 41, en raison notamment de la présence de cystéine. Toutefois, ce peptide diffère visiblement de son homologue de la protéine de référence par une substitution 33 Glu $\longrightarrow$ Gly. L'action de la leucineaminopeptidase (Gly, 0,48 ; Asn, 0,36 ; Leu, 0,32) a permis de vérifier la présence du résidu glycyle en position N-terminale.

Il se trouve que cette substitution Glu $\longrightarrow$ Gly affecte l'un des sites de phosphorylation différentielle mis en évidence dans le travail de BRIGNON (1979). Selon le modèle de MERCIER (voir § II) l'existence du résidu Glu en position 33 conditionne la phosphorylation du résidu Ser en position 31. La substitution dans le variant $\alpha_{s2}C$ d'un résidu glycyle à ce résidu glutamyle implique donc l'absence de phosphorylation du résidu Ser 31 dans ce variant, autrement dit la disparition du site de phosphorylation différentielle représentée selon BRIGNON (1979) par le résidu Ser 31. Il importait donc de vérifier la non phosphorylation du résidu Ser 31, ce qui a été fait à partir de la fraction suivante.

d) Fraction T7. Le peptide CN5T7 contenu dans la fraction T7 a été purifié sur colonne de chromatographie de Sephadex G 25 en acide acétique 30 %. L'hydrolyse ménagée de ce peptide, dont la composition est donnée dans le Tableau 13, confirme l'absence de phosphosérine.

3.5. Conclusions.

En conclusion, les investigations sur le peptide CN5 ont permis de mettre en évidence, par rapport à la protéine de référence (variant $\alpha_{s2}A$) :

- deux substitutions d'acides aminés :
  - 33 Glu $\longrightarrow$ Gly
  - 130 Thr $\longrightarrow$ Ile
- l'absence de groupements phosphates sur les résidus :
  - Ser 31, site de phosphorylation différentielle dans la protéine de référence.
  - Ser 129 et Ser 130, tous deux phosphorylés dans la protéine de référence (figures 17,18).

.../...

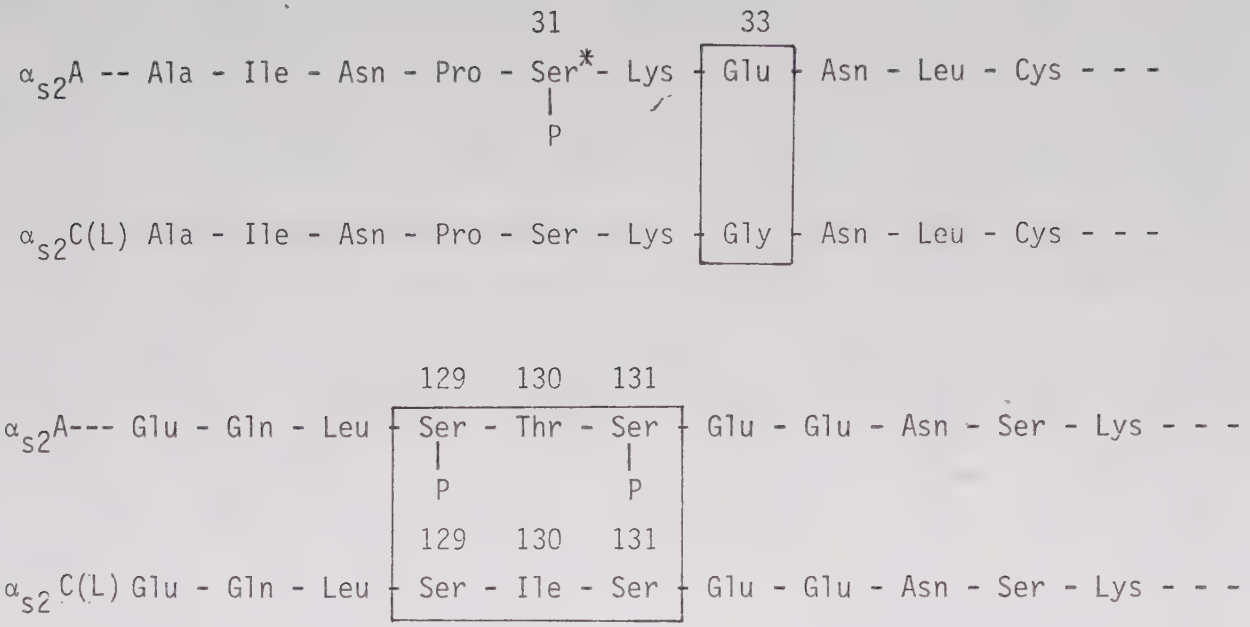


Figure 17. Différences observées entre la fraction L du variant de caséine α_{s2}C et le variant de référence α_{s2}A.
La séquence du variant α_{s2}A est celle établie par BRIGNON (1979).

* Selon cet auteur le résidu Ser 31 serait un site de phosphorylation différentielle.

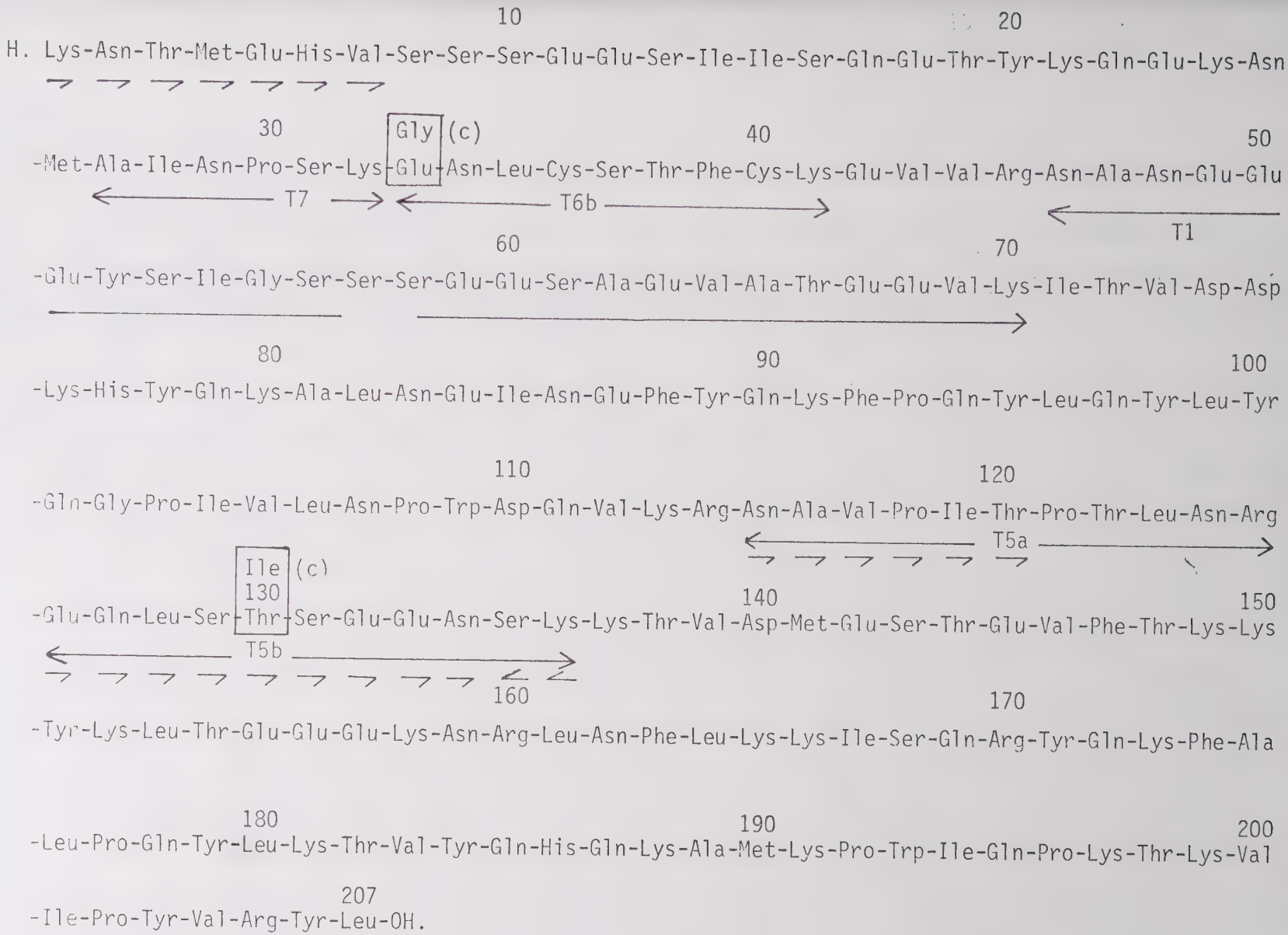


Figure 18. Localisation dans la séquence du variant de référence $\alpha_{s2}A$ (BRIGNON, 1979) des substitutions d'acides aminés spécifiques du variant $\alpha_{s2}C$.

$\longleftrightarrow$: peptide trypsique du variant $\alpha_{s2}C$. $\longrightarrow$: acide aminé libéré par spectrométrie ou dégradation manuelle d'Edman. $\longleftarrow$: acide aminé libéré par action des carboxypeptidases A et B.

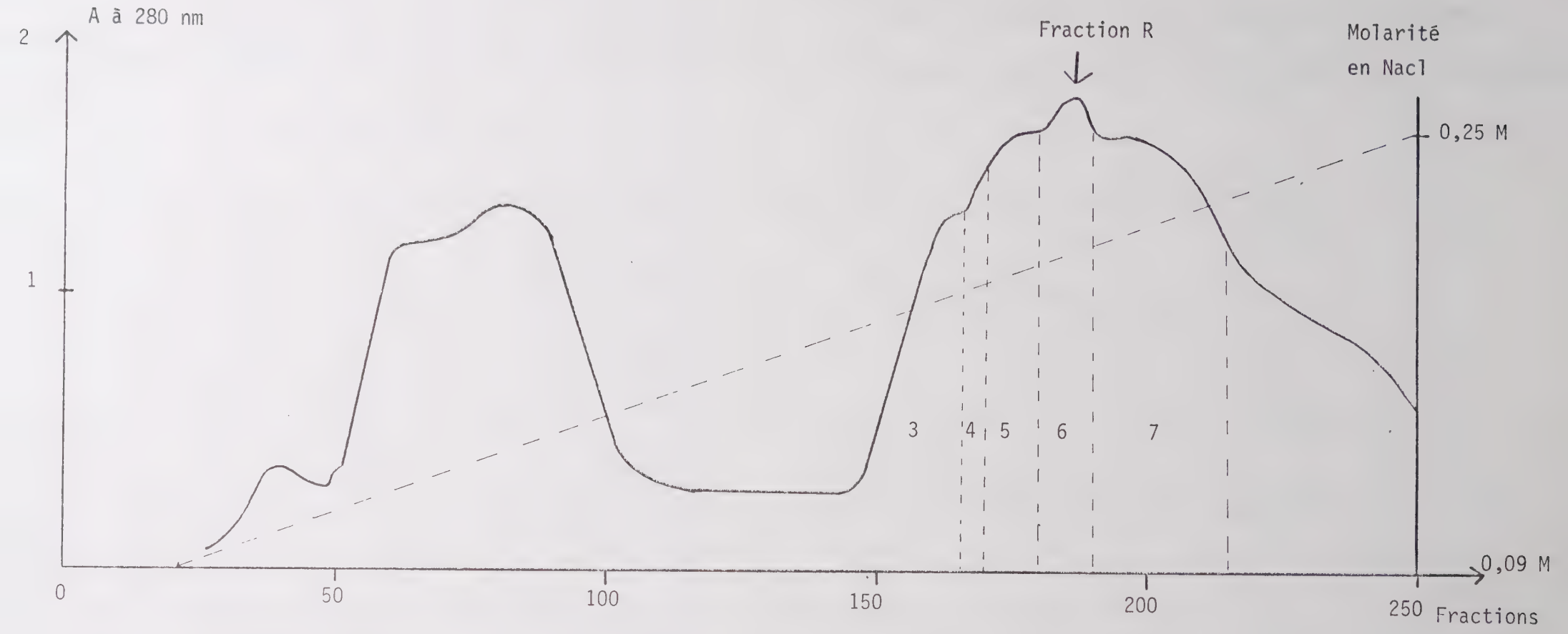


Figure 19 . Chromatographie, sur colonne de DEAE cellulose, du complexe des caséines. α_{s2} et κ du variant $\alpha_{s2}C$.
Colonne : h : 15 cm ; Ø : 6 cm. Tampon imidazole 0,02 M, urée 3,3 M, β- mercaptoéthanol 0,3 %, pH 7,0.
Elution : 70 ml/h. Gradient linéaire en molarité de chlorure de sodium (2 l de tampon 0,09 M ; 2 l de tampon 0,25 M).
Fractions : 15 ml. Absorbance : λ : 280 nm.

En ce qui concerne la charge globale de la protéine elle est donc affectée par la disparition de plusieurs charges négatives : celle du résidu Glu 33, et celles des groupements phosphate des résidus Ser 129 et Ser 131.

4. Préparation de la fraction R.

4.1. Préparation du complexe des caséines α_{s2} et κ.

Une quantité de 20 g de caséine entière a été traitée selon le protocole de THOMPSON et KIDDY (1964). Après centrifugation, le précipité (10 g environ) est constitué des caséines α_{s1}, α_{s2} et κ. Ce mélange a été ensuite soumis à la technique de fractionnement chimique (éthanol 50 %, acétate d'ammonium 0,2 M, pH 7,0) pour séparer, de la caséine α_{s1}, le mélange des caséines α_{s2} et κ. Cette dernière opération, qui n'avait pas été jugée indispensable au cours de la préparation de la bande L, paraissait ici nécessaire ; en effet, la charge globale à pH alcalin de la caséine α_{s1} et celle de la bande R du variant α_{s2}C sont assez voisines, et la séparation de ces deux protéines sur colonne d'échangeurs d'ions aurait pu conduire à de mauvais rendements.

4.2. Chromatographie du complexe des caséines α_{s2} et κ sur colonne de DEAE cellulose.

Le mélange des caséines α_{s2} et κ, contenant encore, en faible quantité, de la caséine α_{s1} a été chromatographié sur colonne de DEAE cellulose, dans le tampon urée 3,3 M imidazole 0,02 M, β-mercaptoéthanol, pH 7,0. L'élution des fractions a été réalisée par un gradient en molarité de chlorure de sodium (0,09 M à 0,25 M) (Figure 19).

Après chromatographie, toutes les fractions ont été dialysées et lyophilisées. La Figure 20 schématise les électrophorégrammes obtenus pour chacune de ces fractions, en électrophorèse en gel d'amidon à pH 8,6 (tampon de WAKE et BALDWIN, avec urée et β-mercaptoéthanol) :

- La fraction 3 contient la fraction lente L à l'état pratiquement pur.

- La fraction 6 contient la fraction rapide R, faiblement contaminée par des fractions mineures interprétées comme étant de la caséine κ très fortement glycosylée.

- La fraction 7 contient un mélange de deux fractions : la fraction R de caséine α_{s2}C, et une fraction lente de caséine α_{s1}. Cette interprétation est confirmée par les résultats d'action, sur la fraction 7, de la carboxypeptidase A.qui libère les résidus terminaux des deux caséines α_{s1} et α_{s2} : Leu, Tyr, Trp (Leu, Trp pour la caséine α_{s1} et Leu, Tyr pour la caséine α_{s2}).

. . . / . . .

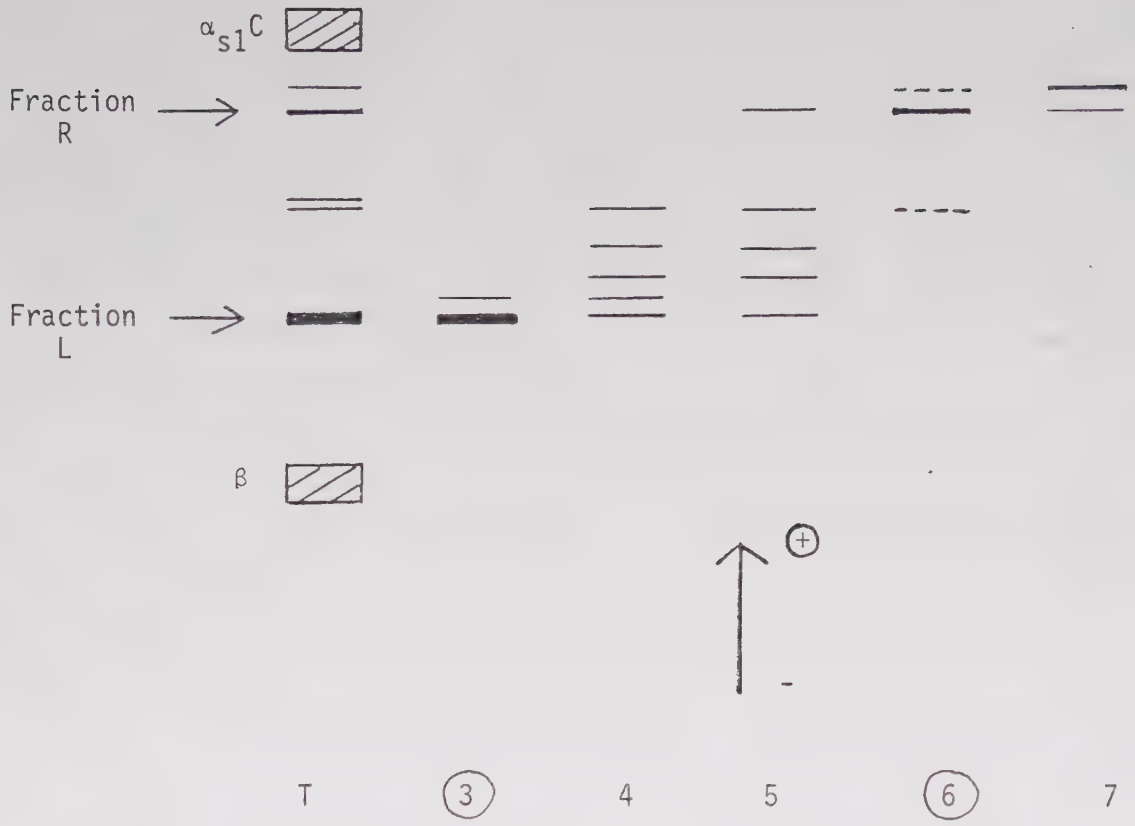


Figure 20 . Electrophorèse des fractions 3, 4, 5, 6 et 7 résultant de la chromatographie du variant $\alpha_{s2}C$ sur colonne de DEAE cellulose (cf. figure 19).

T : témoin de caséine "entière".

Electrophorèse effectuée en gel d'amidon avec urée et β-mercapto-éthanol (pH 3,0). La fraction 6 a servi de matériel de base pour l'analyse biochimique de la fraction R.

La fraction 6 de cette chromatographie, obtenue en quantité de 150 mg a servi à l'analyse biochimique de la fraction R, du variant $\alpha_{s2}C$.

5. Analyse biochimique de la fraction R.

5.1. Dosage du phosphore de la fraction R.

Une quantité de 0,01 µ Mole de fraction R a été soumise à l'hydrolyse acide selon le protocole classique (24, 48 et 96 heures). La composition globale en acides aminés obtenue pour cette protéine ne diffère pas significativement de celle de la fraction L. Toutefois, le dosage du phosphore a donné la valeur de 10,77, soit de 11 groupements phosphate par mole, contre 9 pour la fraction L.

Cette différence de deux groupements phosphate entre les fractions L et R du variant $\alpha_{s2}C$ paraissait pouvoir expliquer la différence de mobilité relative de ces fractions en électrophorèse à pH 8,6. L'analyse s'est donc orientée vers l'identification des groupements phosphates de la fraction R. Il a paru judicieux, à ce stade, et compte tenu des résultats obtenus pour la fraction L, d'étudier en priorité le peptide CN5.

5.2. Préparation et composition du peptide CN5 de la fraction R.

Une quantité de 150 mg de fraction R a été hydrolysée par le bromure de cyanogène. Les peptides ainsi obtenus ont été réduits et alkylés, avant d'être chromatographiés sur colonne de Sephadex G 50, en acide acétique 30 %. Le chromatogramme obtenu s'est avéré identique à celui des peptides de la fraction L. Le peptide CN5, en particulier, a été retrouvé dans la fraction 1 : sa composition en acides aminés (Tableau 14) est voisine de celle du peptide CN5 de la fraction L. Par contre, la valeur obtenue pour le phosphore (7,04 groupements phosphate par mole) est de 3 unités supérieure à celle de ce peptide.

Ces résultats incitaient à entreprendre une étude plus détaillée du peptide CN5.

.../..

Résidus d'acides aminés	CN5		CN5T5		CN5T8	
Asx	13,00	(14)	1,10	(1)	1,04	(1)
Thr	7,22	(7)			0,93	(1)
Ser	8,67	(10)	2,33	(3)	0,93	(1)
Glx	22,83	(22)	3,92	(4)		
Pro	5,48	(6)				
Gly	2,42	(2)			0,93	(1)
Ala	4,33	(6)				
Cys 1/2	a	(2)			1,20	(2)
Val	6,35	(9)				
Met	c	(1)				
Ile	5,49	(6)	0,80	(1)		
Leu	6,93	(7)	0,93	(1)	0,87	(1)
Tyr	5,49	(6)				
Phe	3,17	(3)			0,80	(1)
His	2,02	(1)				
Lys	9,82	(9)	1,80	(2)	0,93	(1)
Arg	2,89	(3)				
Trp	b	(1)				
P	7,04		2,27			
Nombre de résidus		(115)		(12)		(9)

Tableau 14 . Composition en acides aminés et phosphore des peptides CN5, CN5T5 et CN5T8 de la fraction R de la caséine α_{s2}C.

Analyses effectuées à partir d'hydrolysats de 24 heures. Entre parenthèses : valeurs exactes connues pour la caséine α_{s2}A (BRIGNON, 1979).

a : les cystéines ont été dosées dans le peptide trypsique CN5T8.

b : mise en évidence par coloration au réactif d'EHRLICH.

c : méthionine transformée en homosérine lactone.

5.3. Etude des peptides trypsiques du peptide CN5 (variant $\alpha_{s2}C$, fraction R).

5.3.1. Obtention et séparation des peptides.

Une quantité de 4 µ Moles de peptides CN5 a été hydrolysée par la trypsine (E/S : 1/50 ; 2 heures ; 40°C ; tampon bicarbonate d'ammonium, pH 8,0). L'hydrolysat obtenu a été chromatographié sur colonne de Dowex AG 50 WX2, dans les conditions déjà utilisées pour la séparation des mêmes peptides de la fraction L. Le chromatogramme obtenu est schématisé dans la Figure 21.

L'identification des peptides contenus dans les différentes fractions s'est faite par électrophorèse sur papier, en utilisant comme références les peptides obtenus au cours de l'analyse du variant $\alpha_{s2}D$, et au cours de celle de la fraction L du variant $\alpha_{s2}C$.

5.3.2. Identification et composition des peptides.

Après repurification sur colonne de Sephadex G 25, en acide acétique 30 %, la fraction T5 a fourni le peptide CN5T5 de mobilité électrophorétique voisine de celle du peptide trypsique issu de la fraction 3 du variant $\alpha_{s2}D$ et correspondant aux résidus 126 à 137 de la séquence de la caséine α_{s2}; ce peptide témoin du variant $\alpha_{s2}D$ comporte 2 groupements phosphate.

La composition en acides aminés du peptide CN5T5 (Tableau 14) est identique à celle du peptide CN5T5b de la fraction L ; elle comporte aussi par rapport à la séquence de la protéine de référence, la substitution d'un résidu isoleucyle à un résidu thréonyle. Par contre, la teneur en phosphore obtenue pour le peptide CN5T5 de la fraction R est de 2,27, soit deux groupements phosphate, alors que le peptide homologue de la fraction L était dépourvu de groupements phosphate. Par ailleurs, l'action combinée des carboxypeptidases A et B sur le peptide CN5T5 (0,05 Moles ; pH 8,0) libère de la lysine (2,00) mais aussi de l'asparagine et de la sérine (non dosées), ce qui indique que le résidu séryle 136 n'est pas phosphorylé.

L'ensemble des résultats obtenus conduit à la conclusion que les résidus 129 et 131 sont, dans le peptide CN5 de la fraction R, porteurs d'un groupement phosphate.

- La fraction T8 du chromatogramme (Figure 21) a fourni le peptide CN5T8 correspondant aux résidus 33 à 41, et de même composition (Tableau 16) que le peptide homologue de la fraction L, avec, en particulier, et par rapport à la séquence de référence de la caséine α_{s2}, la substitution 33 Glu → Gly. Ce peptide ne comporte pas de groupements phosphate.

... ...

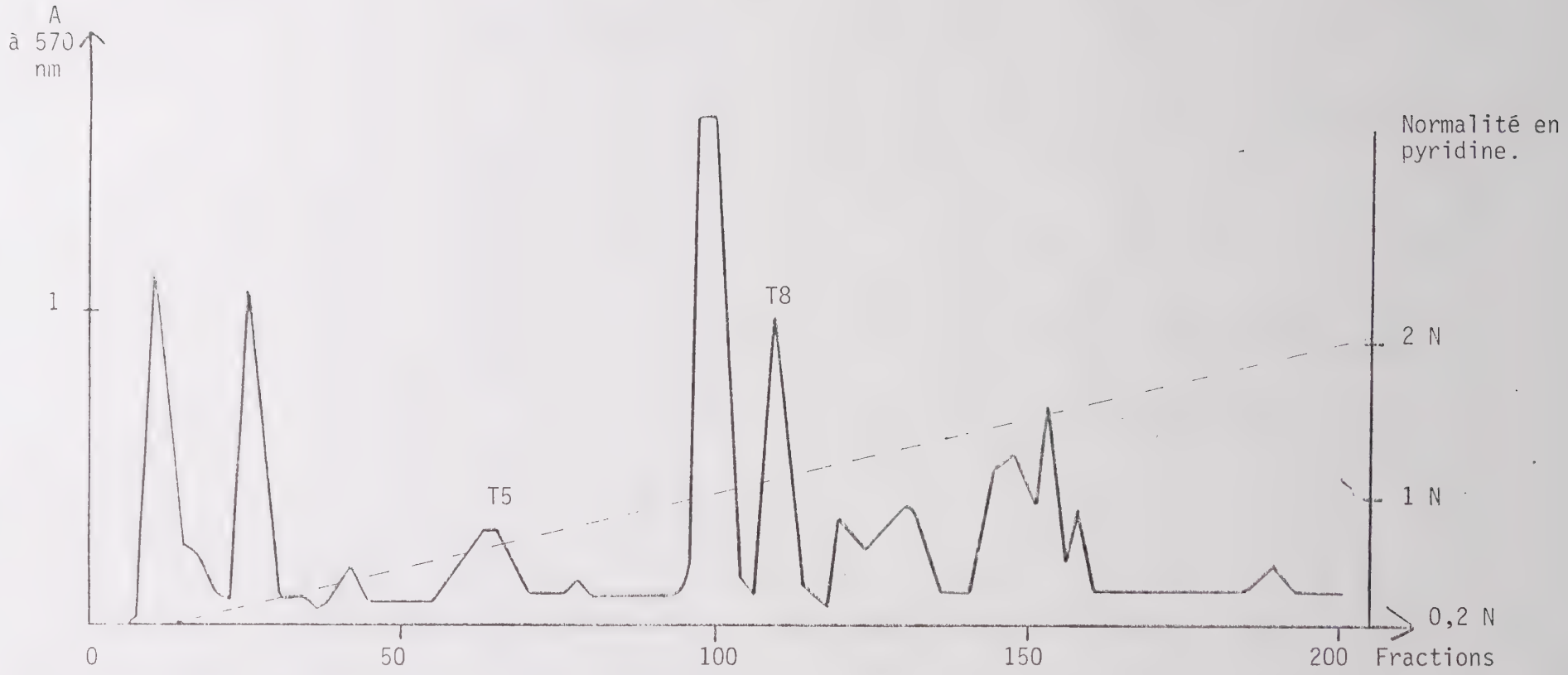


Figure 21 . Chromatographie sur colonne de DOWEX AG 50 WX 2 de l'hydrolysat trypsique du peptide CN5 provenant de la fraction R du variant $\alpha_{s2}C$ (4 moles).

Colonne : h : 60 cm ; Ø : 2 cm. Tampon pyridine-acide acétique (pH 3,1). Température : 40°C. Elution : 40 ml/h. Gradient linéaire en normalité de pyridine (350 ml de tampon pH 3,1 ; 350 ml de tampon pH 5,0). Fractions : 7 ml Hydrolyse alcaline et réaction à la ninhydrine. Absorbance : λ : 570 nm.

5.4. Conclusion de l'étude de la fraction R.

La mise en évidence des deux groupements phosphate supplémentaires dans la fraction R (résidus 129 et 131) suffit à rendre compte de la différence de mobilité électrophorétique entre les fractions R et L. Par ailleurs, la valeur de 7 groupements phosphate obtenue pour le peptide CN5 de la fraction R est interprétée comme une surestimation, pour une vraie valeur de 6. En effet, l'hydrolyse ménagée de CN5 confirme l'absence, dans ce peptide, de résidus phosphothréonyle. Par ailleurs, en ce qui concerne les résidus séryle en-dehors des résidus 56, 57, 58, 61,129 et 131, il n'y a pas d'autres sites potentiels de phosphorylation.

6. Conclusion et discussion générales sur le variant $\alpha_{s2}C$.

Les résultats de l'étude du variant $\alpha_{s2}C$ sont tout à fait cohérents, en ce sens que l'analyse de chacune des fractions L et R a conduit à la mise en évidence par rapport à la séquence de référence de la caséine α_{s2} des deux mêmes substitutions :

33 Glu ⟶ Gly

130 Thr ⟶ Ile

D'autre part,la mise en évidence d'une différence de 2 groupements phosphate entre les fractions R et L permet de rendre compte de la différence de mobilité électrophorétique de ces fractions (figure 22).

Toutefois, si l'on se réfère aux conclusions de BRIGNON (1979) sur la localisation des groupements phosphate dans les fractions 2, 3 et 4 de la caséine α_{s2} de référence (Tableau 15) et plus particulièrement, sur la localisation des sites de phosphorylation différentielle, les résultats obtenus sur le variant $\alpha_{s2}C$ ne permettent pas d'expliquer toutes les particularités électrophorétiques de ce variant si les 4 bandes observées dans les 2 variants sont homologues 2 à 2. On devrait en particulier observer une bande très lente de migration un peu plus cathodique que la caséine β . D'autre part, une hétérogénéité aurait dû être décelée dans le peptide CN5 de la fraction L (Figures 23 et 24).

Ces difficultés d'interprétation conduisaient à réexaminer les conclusions de BRIGNON et al. (1979) sur les sites de phosphorylation différentielle de la caséine α_{s2} et ceci pour deux raisons :

a) la conclusion selon laquelle le résidu Ser 81 serait phosphorylé dans les fractions 2 et 4 et pas dans la fraction 3 ne paraissait pas très logique.

b) des observations faites au cours de l'analyse du variant $\alpha_{s2}D$ et des fractions R et L du variant $\alpha_{s2}C$ étaient en contradiction avec les

. . . . . .

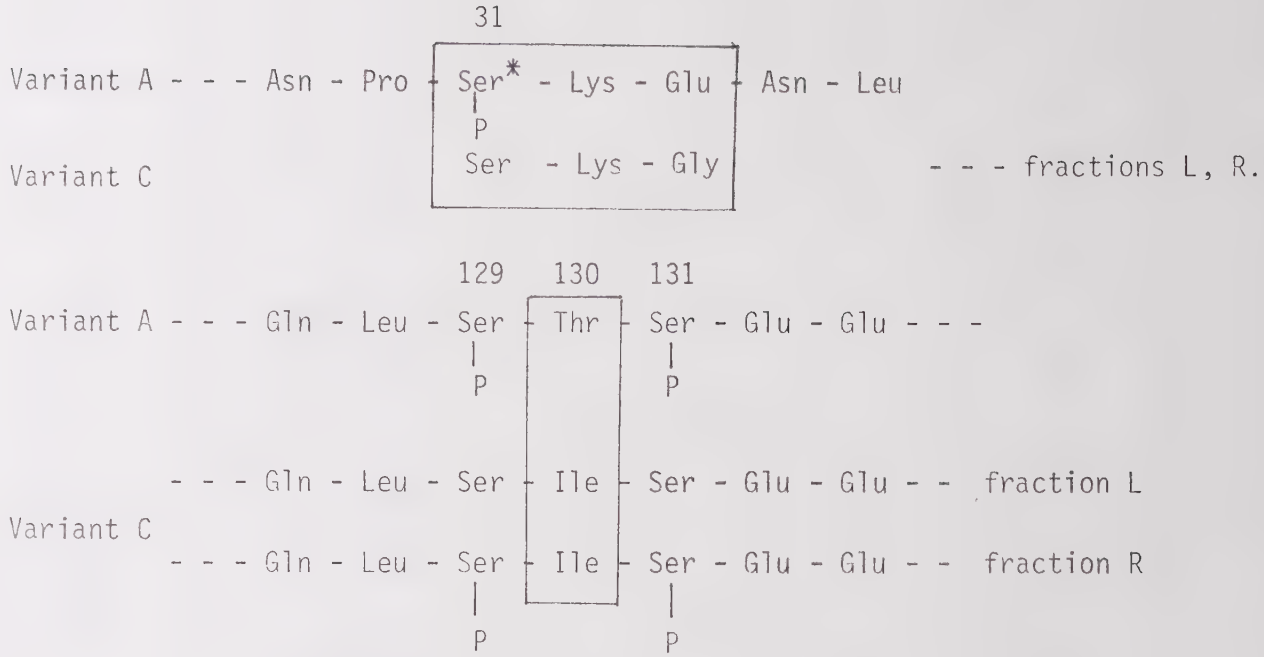


Figure 22 . Différences observées entre les variants de caséine $\alpha_{s2}C$ et $\alpha_{s2}A$.

Les éléments de séquence du variant $\alpha_{s2}C$ établis dans ce travail sont comparés à leurs homologues du variant de référence $\alpha_{s2}A$ (BRIGNON, 1979). Selon cet auteur, le résidu Ser 31 serait partiellement phosphorylé dans ce variant de référence.

Sites potentiels de phosphorylation	Fraction α_{s2}-2	Fraction α_{s2}-3	Fraction α_{s2}-4
Thr 3	-	-	-
Ser 8	+	+	-
Ser 9	+	+	+
Ser 10	+	+	+
Ser 16	+	+	+
Ser 31	+	-	+
Ser 56	+	+	+
Ser 57	+	+	+
Ser 58	+	+	+
Ser 61	+	+	+
Thr 66	+	+	-
Thr 72	-	-	-
Ser 129	+	+	+
Thr 130	-	-	-
Thr 138	-	-	-
Ser 131	+	+	+
Ser 143	+	+	+
Thr 154	-	-	-
Total des groupes phosphates	13	12	11

Tableau 15 . Sites potentiels de phosphorylation de la caséine α_{s2} de référence (variant α_{s2}A) (D'après BRIGNON, 1979).

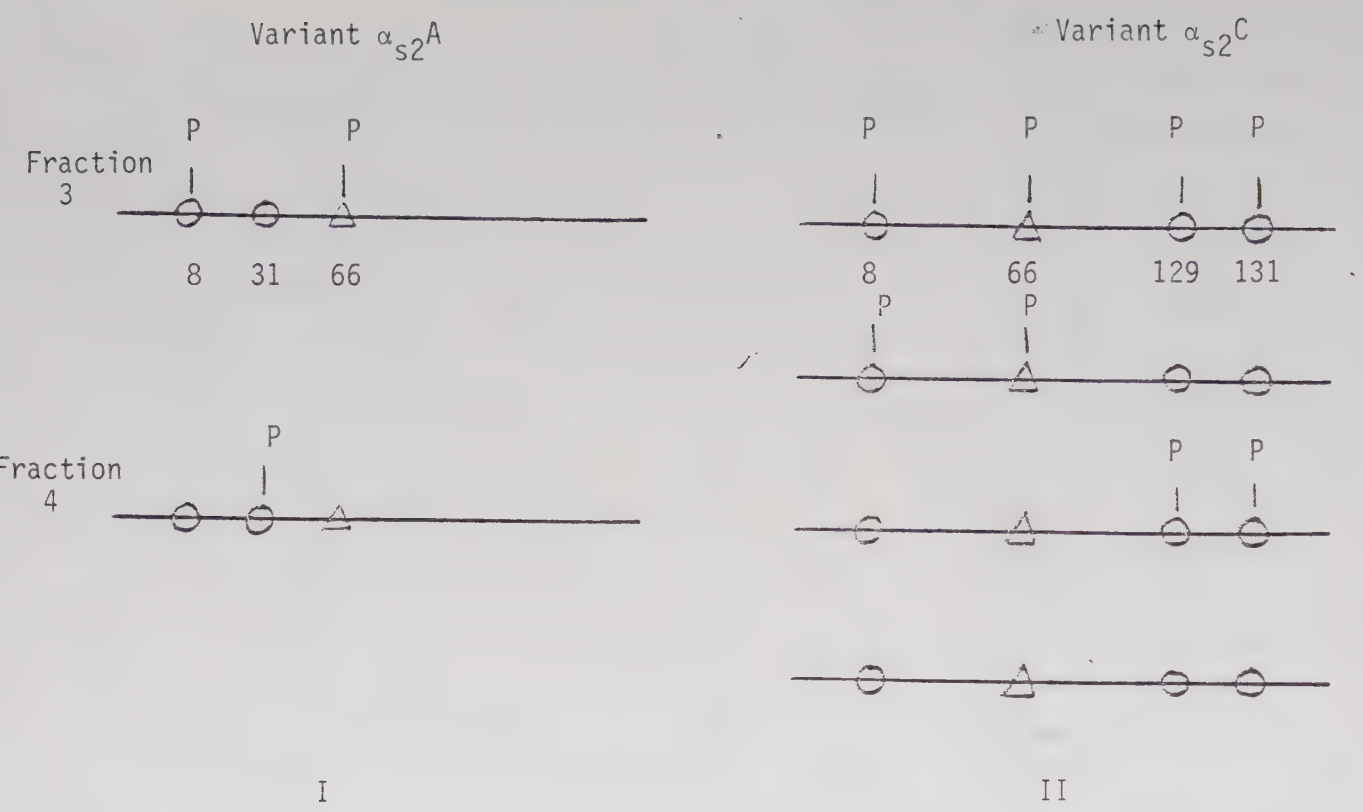


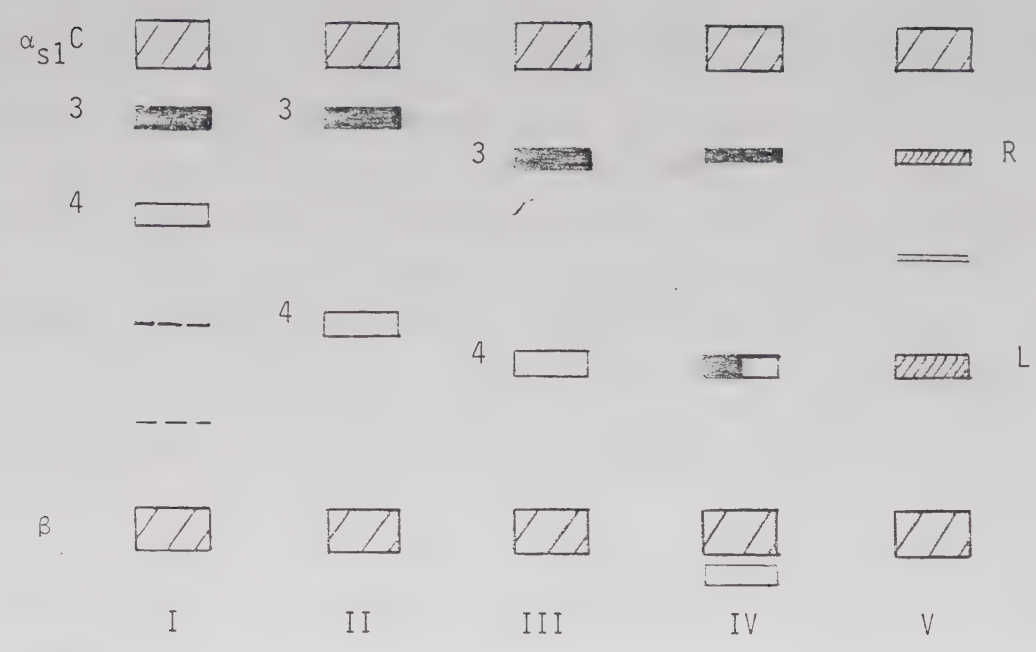
Figure 23. Représentation schématique des sites de phosphorylation différentielle :

I. entre les molécules des fractions 3 et 4 de la caséine α_{s2} de référence (α_{s2}A) selon BRIGNON (1979) ;

II. entre les molécules attendues dans le variant α_{s2}C, sous l'effet des altérations mises en évidence dans le présent travail.

O : Résidu Ser ; △ : Résidu Thr. Seuls les résidus Ser et Thr supposés être des sites de phosphorylation différentielle entre les fractions 3 et 4 du variant α_{s2}A, et leurs fractions dérivées dans le variant α_{s2}C sont représentés sur le schéma. La substitution 33 Glu→Gly supprime en principe, dans le variant α_{s2}C, le site Ser 31. Par contre il apparaît le couple de sites Ser 129 et Ser 131. Aux fractions 3 et 4 du variant α_{s2}A doivent donc correspondre, dans le variant α_{s2}C, 3 fractions dont les sites de phosphorylation différentielle comportent respectivement 0, 2 et 4 groupes phosphate. Ces fractions sont représentées en IV sur la Figure 24 , en tenant compte également de la différence de charge due à la substitution 33 Glu→Gly

NB. Les figures 23 et 24 illustrent, sous une forme différente et complémentaire, la même discussion.



I. Protéine de référence (variant α_{s2}A).

II. Effet de la disparition du groupement phosphate du résidu Ser 31 dans la fraction 4 : la distance entre les bandes 3 et 4 s'accroît de la valeur correspondant à un groupement phosphate.

III. Effet de la substitution 33 Glu→Gly : les bandes 3 et 4 sont toutes deux décalées vers la cathode de la valeur d'une charge.

IV. Effet de la substitution de chacune des fractions 3 et 4 par suite de la non phosphorylation simultanée des résidus séryle 129 et 131 qui touche une partie des molécules de chaque fraction.

V. Variant α_{s2}C.

Figure 24. Effet théorique des altérations découvertes dans le variant α_{s2}C, en prenant pour base les conclusions de BRIGNON (1979) sur la localisation des sites de phosphorylation différentielle de la protéine de référence (variant α_{s2}A). Le passage du patron de la protéine de référence au patron "théorique" du variant α_{s2}C (IV) est décomposé en 3 étapes (II, III, IV) permettant de suivre le raisonnement. Le patron théorique diffère du patron réel (V) par la présence d'une bande plus lente que celle de la caséine β. Par ailleurs sa fraction intermédiaire doit être hétérogène. (La fraction 2 n'a pas été considérée dans ce schéma).

NB. Les figures 23 et 24 illustrent, sous une forme différente et complémentaire, la même discussion.

conclusions de BRIGNON : pas de PSer 31 dans la fraction 4 d' $\alpha_{s2}D$; pas de PThr 66 dans la fraction 3 du même variant et les fractions R et L du variant $\alpha_{s2}C$.

Ces contradictions ont donc conduit à entreprendre quelques vérifications sur les sites de phosphorylation différentielle de la caséine α_{s2}. Ces recherches ont été effectuées non pas sur la protéine de référence ($\alpha_{s2}A$) mais sur le variant $\alpha_{s2}D$. En effet, les diverses fractions de ce variant paraissaient plus faciles à purifier que celles de la protéine de référence. cette option était par ailleurs permise par le fait qu'en principe les sites de phosphorylation différentielle étaient les mêmes dans $\alpha_{s2}D$ que dans $\alpha_{s2}A$.

Cette recherche des sites de phosphorylation différentielle de la caséine α_{s2}, conçue comme une étude préliminaire visant à vérifier les conclusions de BRIGNON (1979) fait l'objet du chapitre suivant.

VII. RECHERCHE PRELIMINAIRE DES SITES DE PHOSPHORYLATION DIFFERENTIELLE DE LA CASEINE α_{s2}.

1. Ligne directrice de l'étude.

Cette étude a consisté à purifier les 3 fractions principales de la caséine α_{s2} (fractions 2, 3, 4), puis à les hydrolyser par le bromure de cyanogène.A partir des peptides CNBr purifiés a été effectuée une recherche comparative des groupements phosphate.

2. Purification des fractions 2, 3 et 4 du variant $\alpha_{s2}D$.

2.1. Préparation chimique du complexe des caséines α_{s1} et α_{s2}.

Une quantité de 20 g de caséine entière a été traitée par la méthode de ZITTLE et CUSTER (1963) et le précipité ainsi obtenu retraité par la méthode de THOMPSON et KIDDY (1964). Le précipité obtenu est un mélange des caséines α_{s1} et α_{s2}. Ce protocole a été répété à plusieurs reprises pour obtenir une quantité importante de caséine α_{s2}.

2.2. Séparation des fractions de la caséine α_{s2} par chromatographie sur colonne de DEAE cellulose.

Le mélange des caséines α_{s1} et α_{s2} a été chromatographié sur colonne de DEAE cellulose microgranulaire dans les mêmes conditions

.../...

qu'au paragraphe 3 (voir aussi Figure 9). Les 3 fractions obtenues, A (fraction $\alpha_{s2}4$), B ($\alpha_{s2}3$), C ($\alpha_{s2}2$) sont impures. Elles contiennent en effet de petites quantités de caséine β ou κ, et peuvent aussi se contaminer entre elles.

2.3. Purification des fractions de caséine α_{s2} par chromatographie sur hydroxyapatite.

L'hydroxyapatite, qui a beaucoup plus d'affinité pour les protéines riches en phosphate, paraissait devoir se prêter à l'élimination,des fractions de caséine α_{s2} (7 à 9 groupements phosphate par molécule), des contaminants de caséine β(5 groupements) et de caséine κ (1 à 2 groupements).

Les fractions A, B et C obtenues précédemment ont donc été chromatographiées sur colonne d'hydroxyapatite (colonne de 2 x 12 cm ; 200 à 500 mg de caséine ; 15 ml/heure). Ces opérations ont permis d'obtenir (Figure 25), après dialyse et lyophilisation, 5 fractions qui ont été examinées par électrophorèse, pour identification :

- La fraction 4 de la caséine α_{s2} se retrouve dans la fraction AI et BI. Elle paraît assez bien purifiée dans AI avec toutefois une contamination possible par la caséine .
- La fraction 3 de la caséine α_{s2} se trouve dans les fractions BII et accessoirement CI. Dans la fraction BII elle est faiblement contaminée par la fraction 4.
- La fraction 2 se trouve dans la fraction CII, mais elle reste contaminée par la fraction 3.

Les fractions 4 (AI), 3 (BII) et 2 (CII) ont toutefois été jugées suffisamment purifiées pour permettre la recherche des groupements phosphate.

2.4. Dosage du phosphore dans les fractions 2, 3 et 4 de la caséine $\alpha_{s2}D$.

Les dosages de phosphore ont été effectués à partir de fractions 2, 3 et 4 repurifiées sur colonne de Sephadex G 50 en tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M, pH 7,8 pour éliminer toute trace d'ion phosphate.

Les valeurs du nombre de phosphore par mole de caséine données par le dosage effectué sur ces fractions repurifiées sont les suivantes:

..../...

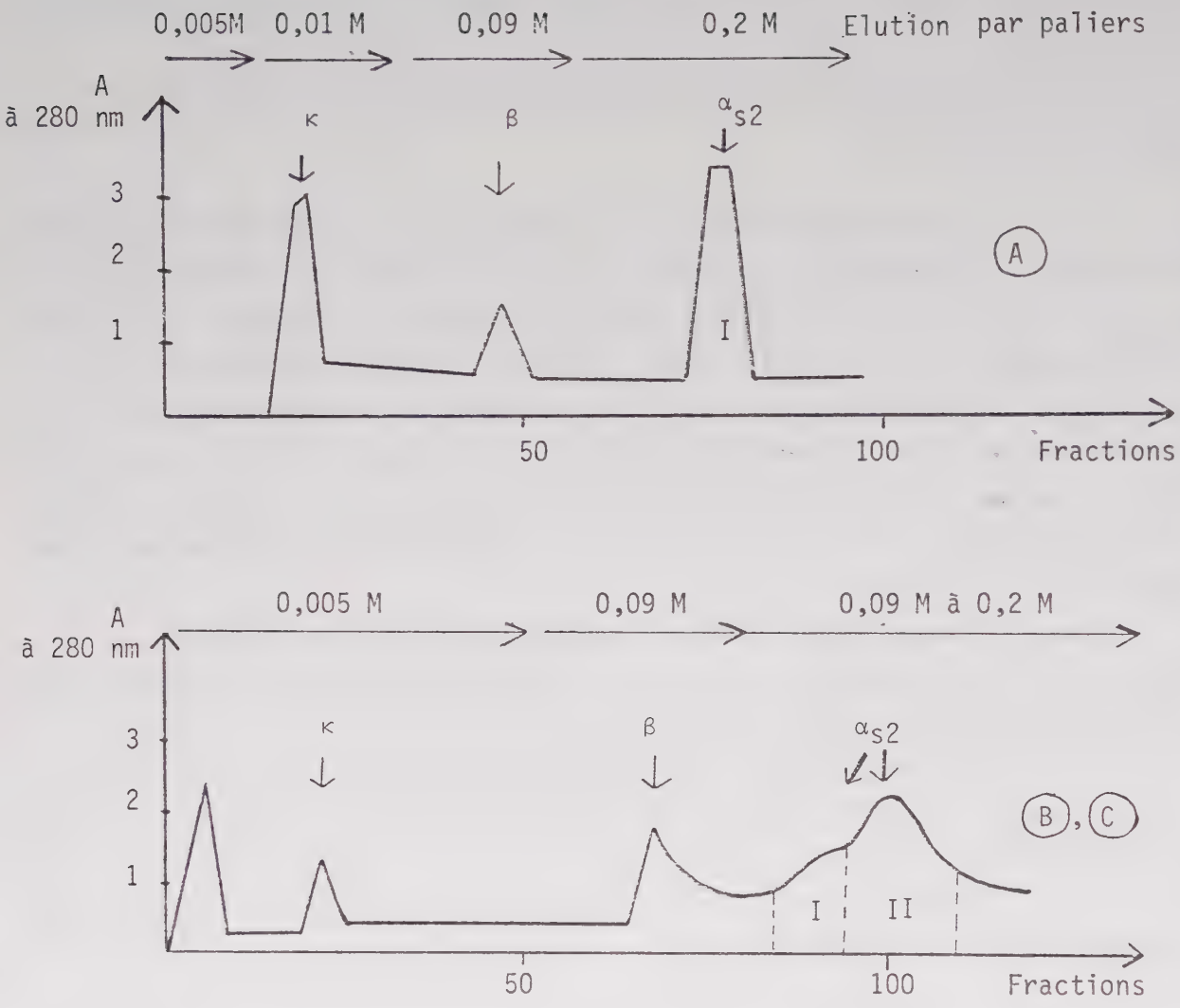


Figure 25. Chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite (Biogel HTP), des fractions A, B, C du variant α_{s2}D (cf. figure 9).

Les fractions de chromatographie contiennent respectivement les fractions électrophorétiques 4, 3 et 2 de la caséine α_{s2} (cf. figure 10). Colonne : h : 12 cm ; Ø : 2 cm. Tampon phosphate de potassium 0,005 M (mono et dipotassique), pH 7,0. Température ambiante. Elution : 15 ml/h. Elution par paliers en molarité de phosphate de potassium. Fractions : 5 ml. Absorbance : λ : 280 nm.

fraction 2 : 8,65
fraction 3 : 7,5
fraction 4 : 5,08.

Les 3 fractions analysées comportant toutes des impuretés moins phosphorylées, les valeurs obtenues ont été considérées comme sous-estimées, et arrondies aux valeurs entières de 9, 8 et 7. L'ajustement à 7 de la valeur 5,08 obtenue pour la fraction 4 se justifie par le fait que, d'après l'électrophorégramme, il n'y a qu'un groupement phosphate de différence entre les fractions 3 et 4. La faible valeur obtenue pour la fraction 4 peut être due à une contamination par la caséine κ (qui ne comporte qu'un groupement phosphate) mal décelée en électrophorèse.

2.5. Recherche qualitative des acides sialiques.

Après action de la neuraminidase (E/S : 1/25 ; 16 heures; 37°C) la mobilité électrophorétique à pH alcalin des fractions 2, 3 et 4 reste inchangée. ce résultat permet en principe d'exclure l'hypothèse selon laquelle l'hétérogénéité électrophorétique de la caséine α_{s2} pourrait être due à une glycosylation différentielle par des groupements à acide sialique terminal. Cette conclusion confirme celle de BRIGNON (1979) qui avait également conclu à l'absence de sucres dans le variant α_{s2}A.

3. Etude comparative des peptides CNBr des fractions 2, 3 et 4 de la caséine α_{s2}D.

3.1. Obtention et comparaison par électrophorèse des peptides CNBr des fractions 2, 3 et 4.

Cette étude avait pour but de rechercher si les différences de charge entre les fractions 2, 3 et 4 pouvaient être retrouvées au niveau de certains des peptides résultant de l'hydrolyse de ces fractions par CNBr.

Les hydrolysats CNBr des fractions 2, 3 et 4 ont donc été comparés par électrophorèse en gel d'amidon avec urée à pH 3,0. Cette technique s'est en effet avérée bien supérieure, pour cette analyse, à l'électrophorèse sur papier qui n'a pas donné une bonne résolution des peptides.

Malgré certaines difficultés d'interprétation, la comparaison des électrophorèses à pH 3, des hydrolysats CNBr des fractions 2, 3, 4, a paru indiquer que seul le peptide CN5 et. éventuellement, le peptide CN2, pouvaient être porteurs de sites de phosphorylation différentielle. Les conclusions sur le

. . . / . . .

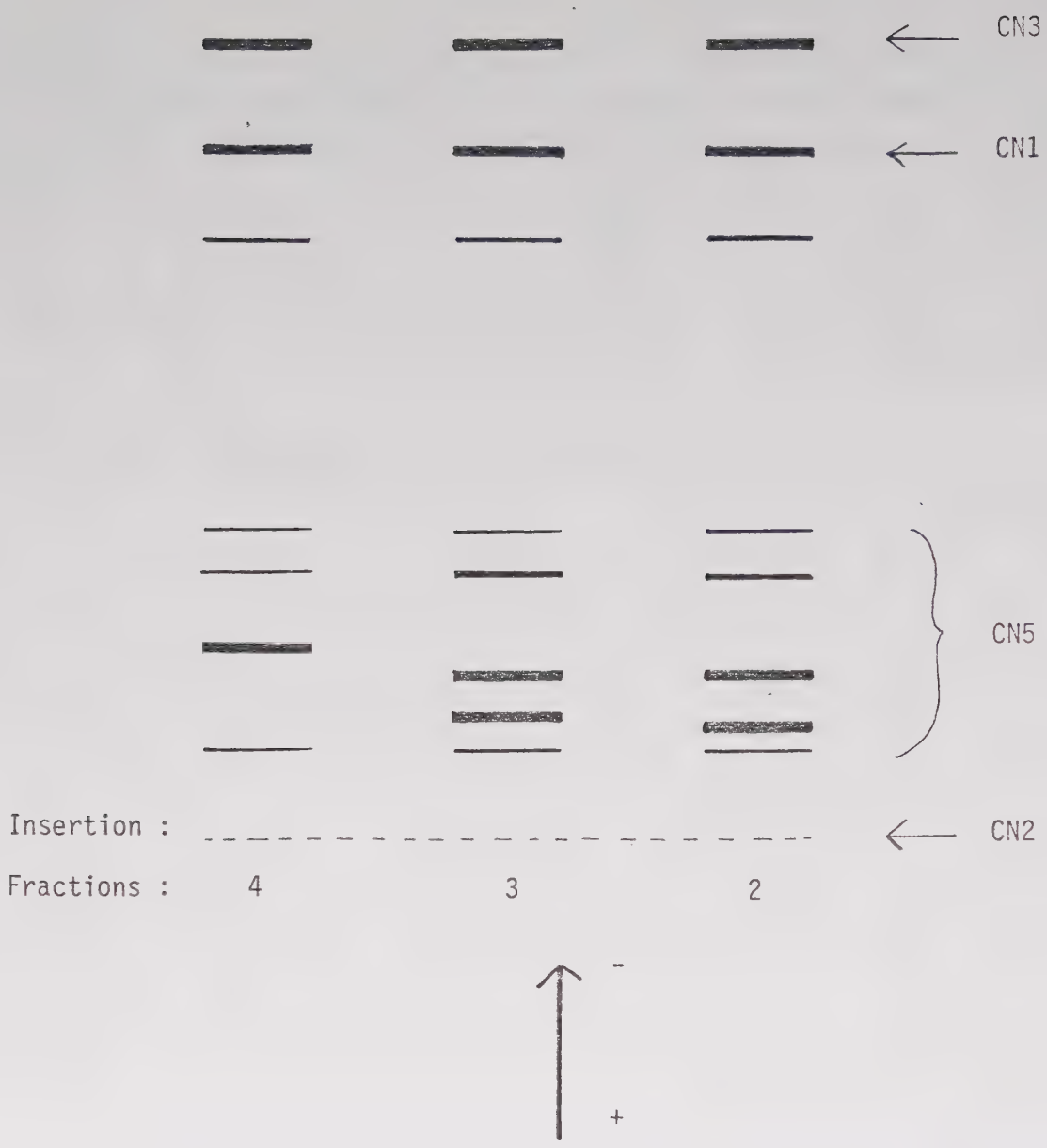


Figure 26 . Electrophorèse des hydrolysats CNBr des fractions 4, 3 et 2 du variant α_{s2}D. Gel d'amidon avec urée et β-mercaptoéthanol, pH 3,0. Le peptide CN2 est resté au niveau de la ligne d'insertion.

peptide CN2 étaient incertaines car ce peptide reste apparemment au niveau du point d'insertion des échantillons (figure 26).

Les peptides CNBr des 3 fractions ont ensuite été purifiés suivant le même protocole que celui décrit au paragraphe 3.

3.2.Recherche et dosage du phosphore dans les peptides CNBr des fractions 2, 3 et 4.

Une recherche des phosphoaminoacides a d'abord été effectuée, sur les peptides CNBr des fractions 2, 3 et 4 par électrophorèse sur papier, à pH 1,9 après hydrolyse acide ménagée. Les conclusions de cette recherche ont été les suivantes :

- absence de phosphothréonine dans tous les peptides, contrairement à ce qu'avait observé BRIGNON (1979) pour le variant A ;
- présence de phosphosérine dans les peptides CN1, CN2 et CN5, conformément aux résultats du même auteur sur la protéine de référence (variant $\alpha_{s2}A$).

Un dosage colorimétrique du phosphore a donc été effectué dans les peptides CN1, CN2 et CN5 des fractions 2, 3 et 4.

Les résultats obtenus (Tableau 16) suggéraient que les sites de phosphorylation différentiels entre les fractions 2, 3 et 4 n'étaient localisés que dans le peptide CN5. Ceci conduisait à entreprendre une analyse plus précise des peptides CN5 des 3 fractions.

3.3. Obtention et analyse des phosphopeptides trypsiques du peptide CN5 des fractions 2, 3 et 4.

Les peptides trypsiques du peptide CN5 de chacune des fractions 2, 3 et 4 ont été préparés comme au paragraphe 3 par fractionnement sur colonne de Dowex AG 50 WX2 et repurification sur colonne de Sephadex G 25, ou par électrophorèse préparative sur papier. Les recherches ont porté plus particulièrment sur ceux des peptides trypsiques qui étaient susceptibles de comporter un site de phosphorylation différentielle, avec une séquence code compatible avec le modèle de MERCIER (1971).

Le Tableau 17 donne la liste de ces peptides, la position des phosphoaminoacides éventuellement concernés, et les résultats de l'hydrolyse acide ménagée sur tous ces peptides.

Ces résultats confirmaient l'absence de phosphothréonine dans tous les peptides, et concluaient également à la non phosphorylation du

..../...

Caséine α_{s2}^D	α_{s2}	α_{s3}	α_{s4}
CN1	1,33 (1)	1,12 (1)	0,99 (1)
CN2	4,12 (4)	3,89 (4)	3,73 (4)
CN5	4,43 (4)	3,44 (3)	2,50 (2-3)
Nombre de P	(9)	(8)	(7-8)

Tableau 16 . Dosage du phosphore dans les peptides CN1, CN2 et CN5 provenant des fractions 2, 3 et 4 de la caséine α_{s2}^D.
Dosage selon BAMANN et NOVOTNY (1948).
Entre parenthèses : valeurs arrondies au nombre entier le plus proche.

Peptides trypsiques du peptide CN5	Résidus	Fractions électrophorétiques		
		2	3	4
T6 (27-32)	Ser 31	-	-	-
T1 (46-70)	Ser 61	+	+	+
	Thr 66	-	-	-
T5 (71-76)	Thr 72	-	-	-
T2 ou T4 (126-137)	Ser 129 } Ser 131 }	+	+	+
	Thr 130	-	-	-
T3 (138-141)	Thr 138	-	-	-

Tableau 17. Recherche des phosphoaminoacides par hydrolyse acide ménagée, dans ceux des peptides trypsiques du peptide CN5 qui sont suceptibles d'être phosphorylés. Cette recherche a été effectuée parallèlement à partir des fractions 2, 3 et 4 de la caséine α_{s2}D.

Dans la colonne 1, la numérotation des résidus terminaux des peptides a été donnée par homologie à celle des mêmes peptides de la protéine de référence.

+ : présence de phosphoaminoacides ; - : absence.

résidu Ser 31 dans les 3 fractions, contrairement, pour ces deux points, aux résultats de BRIGNON (1979) obtenus sur le variant A.

En définitive ces résultats indiquaient que seuls les peptides T2 ou T4 pouvaient comporter les sites de phosphorylation différentielle recherchés. D'autre part, comme le peptide T4 était élué plus tardivement que le peptide T2,on pouvait supposer que ce peptide comportait, par rapport à T2, un groupement phosphate en moins.

3.4. Localisation, dans le peptide CN5T4, du site de phosphorylation différentielle entre les fractions 3 et 4.

Le peptide T2, provenant des fractions 2 et 3 de la caséine $\alpha_{s2}D$, et le peptide T4, provenant de la fraction 4 correspondent à la séquence suivante de la protéine de référence :

```
126          129     131                    137
Glu-Gln-Leu-Ser-Thr-Ser-Glu-Glu-Asn-Ser-Lys-Lys-
             |       |
             P       P
```

Un dosage du phosphore, effectué sur T2 et T4 a donné les valeurs suivantes :

T2 : 2,03, soit 2 groupements phosphate/mole.
T4 : 1,05, soit 1 groupement phosphate/mole.

Ce résultat confirme que le peptide ci-dessus comporte le site de phosphorylation différentielle des fractions 3 et 4 du variant $\alpha_{s2}D$, qui ne peut être que l'un des deux résidus séryle 129 ou 131.

Par manque d'une quantité suffisante de peptide T4 pour mener l'étude à son terme, le site n'a pas pu être définitivement identifié. Toutefois, il est vraisemblable qu'il s'agit du résidu Ser 129, qui est un site secondaire de phosphorylation, par rapport au site primaire Ser 131 (MERCIER 1981).

4. Discussion et conclusion.

Comme il a été dit au début de ce chapitre, l'étude entreprise pour identifier les sites de phosphorylation différentielle de la caséine [illegible] est une étude préliminaire, qui devra être complétée par une analyse beaucoup

. . . / . . .

plus précise et détaillée. On remarquera en particulier que le site de phosphorylation différentielle des fractions 2 et 3 n'a pas pu être identifié à ce stade.

L'étude complémentaire à entreprendre s'avère délicate. En effet, il ressort du travail ci-dessus que la fraction 4 a fourni à la fois le peptide T4, mais aussi - en quantité plus faible il est vrai - le peptide T2. Cette observation suggère, à moins que T2 ne provienne d'une impureté, que chacune des fractions 2, 3 et 4 pourrait elle même être hétérogène. Dans cette hypothèse, les molécules de la fraction 4 qui comportent le peptide T2 doivent avoir, par ailleurs, perdu un groupement phosphate à un autre site, sinon elles migreraient à un autre niveau. L'hypothèse que les fractions 2, 3 et 4 puissent recéler une hétérogénéité interne est tout à fait plausible, et même attendue, si l'on admet l'existence d'au moins deux sites de phosphorylation différentielle indépendants.

Dans l'immédiat, les résultats obtenus ne correspondent pas sur plusieurs points à ceux trouvés par BRIGNON (1979) sur le variant A.Ils incitent donc à reprendre l'étude des sites de phosphorylation différentielle de la caséine α_{s2}. Toutefois, comme il peut toujours rester un doute sur les différences existant entre α_{s2}D et la protéine de référence (α_{s2}A), les recherches complémentaires devront d'abord porter sur cette dernière.

Dans l'immédiat, les résultats obtenus, et en particulier, l'identification du résidu 129 Ser comme site de phosphorylation différentielle des fractions 3 et 4 peuvent être retenus comme une base de travail sérieuse. Ils permettent de reconsidérer sous un autre angle les différences de patron électrophorétiques entre le variant α_{s2}C et la protéine de référence. Cette analyse sera faite dans la discussion de la présente Thèse.

VIII. DISCUSSION ET CONCLUSION.

La caséine α_{s2} est certainement celle des 4 caséines bovines dont l'étude biochimique s'est avérée la plus difficile, en raison de son hétérogénéité, et de la faible différence de charge relative entre ses diverses fractions. Celles-ci sont donc difficiles à purifier les unes des autres par les méthodes de fractionnement chimique et de chromatographie actuellement disponibles ; certaines d'entre elles sont également difficiles à séparer de contaminants de caséine α_{s1}. Ces difficultés ressortent bien du travail de BRIGNON (1979).

L'étude biochimique des variants α_{s2}C et α_{s2}D aurait été rendue très délicate, voire presque impossible si l'on n'avait disposé pour cette étude que de laits de vaches hétérozygotes pour ces variants. Dans ce cas certaines

.../...

des fractions du variant à étudier n'auraient pas pu être séparées des fractions du variant de référence également présent chez l'hétérozygote. Nos efforts ont donc porté, d'abord, sur la recherche de vaches homozygotes pour les variants à étudier.

Parmi les échantillons étudiés en provenance du Népal, 3 provenaient de vaches homozygotes pour le variant $\alpha_{s2}C$ (GROSCLAUDE et al., 1976 b). Toutefois, les faibles quantités de lait obtenues (10 ml environ) ne permettaient pas d'entreprendre l'étude biochimique projetée, et il était impossible d'avoir à nouveau accès aux animaux. Heureusement, une série d'échantillons de laits de yaks de République populaire de Mongolie a pu être analysée dans notre Laboratoire (Résultats non publiés), et deux des laits de vaches homozygotes ont pu être, cette fois, obtenus en plus grande quantité, grâce à l'obligeance des autorités Mongoles et à celle de J.P. ACCOLAS (Département de Technologie animale de l'INRA).

En ce qui concerne le variant $\alpha_{s2}D$, la probabilité de trouver une vache homozygote était assez faible, puisque ce variant avait été découvert dans une race de très petits effectifs, la race Vosgienne, ainsi qu'avec une fréquence très faible dans la race Montbéliarde. Toutefois les analyses effectuées dans ces deux races ont permis d'identifier, dans la Vosgienne, deux vaches homozygotes pour le variant $\alpha_{s2}D$. L'une d'entre elle ayant rapidement disparu, nous avons toutefois pu obtenir en grandes quantités, et à plusieurs reprises, du lait de la seconde.

L'étude biochimique des variants $\alpha_{s2}C$ et $\alpha_{s2}D$ n'a donc été rendue possible que grâce à toutes les démarches préliminaires qui ont permis d'obtenir en quantités suffisantes, du lait de vaches homozygotes pour ces variants.

Cependant, en raison des difficultés déjà évoquées, liées à l'hétérogénéité de la caséine α_{s2}, mais aussi parce qu'il s'agit d'une protéine de taille non négligeable (207 résidus), il était exclu d'entreprendre une étude systématique et complète de la séquence des acides aminés de chacun des deux variants. Nous avons donc adopté une stratégie consistant à identifier le plus tôt possible, le ou les peptides comportant l'altération ou les altérations spécifique (s) du variant étudié, à analyser en détail ce (s) peptide (s) et à confronter nos résultats avec les observations faites sur les caractéristiques électrophorétiques du variant.

.../...

Dans l'étude du variant $\alpha_{s2}D$ les résultats obtenus ont permis d'expliquer de manière satisfaisante les particularités électrophorétiques du variant. Dans celle du variant $\alpha_{s2}C$, cela n'a pas été le cas, et nous avons donc été amenés à procéder à certaines vérifications sur le variant de référence, avant d'arriver à des conclusions acceptables.

La stratégie adoptée peut être discutée. Il est clair qu'elle ne permet pas d'identifier les substitutions d'acides aminés n'ayant pas d'effet sur la charge de la protéine. Toutefois, lorsque l'on s'intéresse à des variants électrophorétiques cette classe de substitution neprésente qu'un intérêt secondaire puisque, de toutes manières, elle ne peut être étudiée systématiquement. Mais on pourrait aussi objecter que des altérations ayant un effet sur la charge ont pu échapper à l'analyse, sous la forme où elle a été conduite. Toutefois, les résultats obtenus permettent d'expliquer correctement les caractéristiques des deux variants, ce qui renforce la vraisemblance des conclusions.

Le variant $\alpha_{s2}D$, comporte, en électrophorèse, le même ensemble de bande qui sont seulement - mais amplement - décalées vers la cathode. Cette conservation du "patron" électrophorétique suggérait que l'altération spécifique de ce variant touchait une partie de la chaîne polypeptidique commune aux différentes fractions de la caséine α_{s2}. D'autre part, le fort décalage du variant $\alpha_{s2}D$ par rapport au type de référence indiquait que l'altération n'était pas une simple substitution d'acides aminés. Ces hypothèses de départ ont été confirmées par la mise en évidence, dans le variant $\alpha_{s2}D$, d'une délétion d'un segment de 9 résidus d'acides aminés, comportant notamment 3 résidus PSer et 2 résidus Glu. Cette délétion rend parfaitement compte des particularités électrophorétiques du variant $\alpha_{s2}D$.

L'étude du variant $\alpha_{s2}D$ a ainsi permis de mettre en évidence un second cas de délétion, sur un total de 18 variants de caséine étudiés, le premier exemple ayant été celui du variant $\alpha_{s1}A$ (GROSCLAUDE et al., 1970) qui comporte une délétion d'un segment de 13 résidus dans sa partie N-terminale, ce qui lui confère des propriétés physicochimiques particulières (la taille des micelles, par exemple est différente) (DEWAN et al., 1974). De ce dernier point de vue, il serait intéressant d'étudier les particularités physicochimiques du variant $\alpha_{s2}D$. Ce variant a en effet perdu un élément de séquence très acide (présent aussi dans les caséines α_{s1} et β) et qui joue sans doute un rôle important dans la fixation du calcium, donc dans la stabilité de l'édifice micellaire.

.../...

Il est intéressant de remarquer que l'élément de séquence amputé du variant $\alpha_{s2}D$ est précisément homologue d'un élément de séquence comportant le noyau SerP-SerP-SerP-Glu-Glu que l'on trouve dans la caséine α_{s1} (résidus 66-70), dans la caséine β (17-21) et deux fois dans la caséine α_{s2} (résidus 8 à 12 et 56 à 60). Le segment d'ADN correspondant serait donc susceptible, plus facilement que d'autres, d'être amputé ou transloqué ; il jouerait ainsi un rôle particulier dans l'évolution des gènes des caséines. En tout état de cause, il semble que l'évolution des gènes des caséines se soit faite, comme c'est le cas pour les gènes d'autres protéines (DAYHOFF, 1972, 1978) non par duplication de gènes entiers, mais par une succession d'évènements portant sur des segments plus réduits (GROSCLAUDE, 1979, RIBADEAU-DUMAS et al,1975), comme l'attestent également les différences obtenues entre les caséines d'autres espèces (RICHARDSON et al., 1979 ; GROVES et al., 1978). La délétion spécifique du variant $\alpha_{s2}D$ pourrait être un évènement récent de ce type. Elle n'a toutefois aucune chance d'être fixée dans l'espèce, et paraît plutôt vouée à l'élimination.

En ce qui concerne $\alpha_{s2}C$, GROSCLAUDE et al.(1976 b) avaient suggéré que l'altération spécifique de ce variant portait sur un site de phosphorylation différentielle, puisque le "patron" électrophorétique était assez différent de celui de la protéine de référence. Les résultats obtenus dans ce travail confirment cette hypothèse, mais d'une manière inattendue. En effet la substitution 130 Thr $\longrightarrow$ Ile a pour effet de maintenir une phosphorylation différentielle dans la zone du variant $\alpha_{s2}C$ qu'elle affecte, mais sous une forme différente de celle qui caractérise la protéine de référence : dans celle-ci c'est le résidu 129 Ser qui est selon toute vraisemblance partiellement phosphorylé ; dans le variant α_{s2C},ce sont les deux résidus, 129 Ser et 131 Ser, et de façon apparemment concomittante.

Ce résultat inattendu appelle une tentative d'explication. On peut supposer que dans la protéine de référence le résidu 130 Thr présenterait une certaine affinité pour la kinase, qui ne pourrait pas toutefois, catalyser la phosphorylation du résidu. Cette situation pourrait gèner l'action de la kinase sur le résidu 129 Ser, d'où la phosphorylation partielle de ce résidu. Par contre, dans le variant $\alpha_{s2}C$, la présence du résidu Ile en position 130 gènerait pour une raison inconnue, la phosphorylation du résidu 131 Ser, d'où une phosphorylation partielle de ce résidu. Par contre le résidu Ile ne gènerait en aucune manière l'action de la kinase sur le résidu 129 Ser. Cependant, comme, en fonction du code de phosphorylation, ce résidu ne peut être phosphorylé que si le résidu 131 Ser l'est déjà, le résidu 129 Ser ne serait phosphorylé que sur les chaînes polypeptidiques où le résidu 131 Ser est lui-même phosphorylé.

..../...

Ainsi, dans la protéine de référence, le résidu 130 Thr serait la cause principale de la phosphorylation différentielle, avec une conséquence sur le résidu 129 Ser. Par contre, dans le variant $\alpha_{s2}C$, le résidu 130 Ile serait la cause principale de la phosphorylation différentielle, avec une conséquence primaire sur le résidu 131 Ser. On notera que, dans les deux cas, c'est le résidu 130 qui joue le rôle déterminant.

Ce résultat apporte un élément nouveau à l'ensemble des observations faites jusqu'à présent sur les sites de phosphorylation des caséines. Il complique dans une certaine mesure l'idée quel'on peut se faire du mécanisme, en attirant l'attention sur le rôle que peuvent jouer des résidus autres que les deux résidus principaux (hydroxyaminoacide en position n, et résidu à charge négative en position n + 2).

Les conclusions de BRIGNON (1979) sur la localisation des sites de phosphorylation différentielle de la protéine de référence ne nous paraissaient pas tout à fait logiques. Elles faisaient apparaître 3 sites de phosphorylation différentielle (Ser 8, Ser 31 et Thr 66), mais le fait que le résidu 31 Ser pouvait être phosphorylé dans les fractions 2 et 4, et pas dans la fraction 3 était peu crédible. Il laissait supposer que la phosphorylation ne se faisait pas de manière indépendante à des sites relativement éloignés de la chaîne polypeptidique.

Il est apparu au cours de ce travail, que les conclusions de BRIGNON ne permettaient pas de rendre compte de toutes les particularités électrophorétiques du variant $\alpha_{s2}C$, si l'on admettait comme exacts nos résultats sur ce variant.

L'étude complémentaire effectuée sur le variant D nous a conduit à des résultats préliminaires différents de ceux de BRIGNON pour le variant $\alpha_{s2}A$. Comme ces résultats permettent d'expliquer le "patron" électrophorétique du variant $\alpha_{s2}C$, ils nous paraissent plus fiables que ceux de BRIGNON.

Toutefois, il serait indispensable de procéder à une étude plus approfondie des sites de phosphorylation de la caséine α_{s2}. Ce travail, pour plus de généralité, devrait être effectué sur la protéine de référence, et non sur le variant $\alpha_{s2}D$, comme nous l'avons fait pour des raisons de commodité. Il faut d'ailleurs s'attendre à ce que certaines des fractions électrophorétiques

. . . . / . . .

soient elles-mêmes hétérogènes - ce qui compliquera l'analyse - si la phosphorylation se fait indépendamment aux divers sites.

Par ailleurs la présence de phosphothréonine dans la caséine α_{s2} paraît avoir été bien établie par BRIGNON (1979), et paraît plausible. En effet ce phosphoaminoacide, identifié dès 1953 par DE VERDIER, dans la caséine entière, n'existe en principe pas dans les autres caséines (sauf le variant α_{s1}D) et on peut donc s'attendre à le trouver dans la caséine α_{s2}. Nos travaux n'ont pas permis de l'identifier jusqu'ici, ce qui conduirait à le rechercher dans la fraction 2 que nous avons peu étudiée.

Une des particularités du variant α_{s2}C est l'existence de deux substitutions d'acides aminés distinctes (33 Glu→Gly, 130 Thr→Ile) ayant des effets sur la charge de la protéine (effets indirects pour la substitution 130 Thr→Ile). On peut se poser la question de savoir si les deux évènements génétiques correspondants ont été simultanés ou successifs. A ce sujet, on notera que l'hypothétique variant intermédiaire (dans l'hypothèse de mutation sucessives) n'a pas été observé chez le yak. Toutefois il ne s'agit pas là d'un argument décisif pour trancher en faveur de l'hypothèse de simultanéité des évènements.

Ajoutons enfin que le variant α_{s2}B, découvert chez des taurins et zébus népalais (GROSCLAUDE et al., 1976 b), et apparemment retrouvé chez des zébus sud-africains (GUERIN, Communication personnelle) n'a pu être étudié jusqu'ici faute d'une quantité suffisante de caséine.

En définitive, l'analyse biochimique des deux variants de caséine α_{s2}, α_{s2}C et α_{s2}D, a permis de complèter l'ensemble déjà important de nos connaissances sur les caséines bovines. Outre la mise en évidence d'un cas intéressant de délétion, elle a apporté des éléments permettant de nuancer la conception que l'on peut se faire du code de phosphorylation des caséines bovines auquel les équipes de l'INRA ont porté beaucoup d'attention depuis une dizaine d'années (MERCIER et al., 1971 ; GROSCLAUDE et al., 1979). Les conclusions de ce travail appellent aussi un réexamen approfondi des sites de phosphorylation différentielle de la caséine α_{s2} , étude actuellement en cours dans notre Laboratoire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABE T., KOMATSU M., OISHI T., KAGEYAMA A., 1975. Genetic polymorphism in milk proteins in three Japanese cattle and four European breeds in Japan. Jap. J. Zoot. Sci. 46, 591-599.

ADDEO F., 1978. Communication personnelle.

ADDEO F., CHOBERT J-M., RIBADEAU-DUMAS B., 1977. Fractionation of whole casein on hydroxyapatite. Application to a study of buffalo κ-casein. J. Dairy Res., 44, 63-68.

ANDREWS A.T., 1978. a) The composition, structure and origin of proteose-peptone component 5 of bovine milk. b) The composition structure and origin of proteose-peptone component 8 F of bovine milk. Europ. J. Biochem. 90, a) 59-65 ; b) 67-71.

ANNAN W.D., MANSON W., 1969.. A fractionnation of α_s casein complex of bovine milk. J. Dairy Res., 36, 259-268.

ASCHAFFENBURG R., 1961. Inherited casein variants in cow's milk. Nature, 192, 431-432.

ASCHAFFENBURG R., 1963. Inherited casein variants in cow's milk. II. Breed differences in the occurrence of β-casein variants. J. Dairy Res., 30, 251-258.

ASCHAFFENBURG R., 1968. Genetic variants of milk proteins ; their breed distribution. J. Dairy Res., 35, 447-460.

ASCHAFFENBURG R., DREWRY J., 1955. Occurrence of different β-lactoglobulins in cow's milk. Nature, 176, 218-219.

ASCHAFFENBURG R., DREWRY J., 1957. Genetics of the β-lactoglobulins of cow's milk. Nature, 180, 376-378.

BAMANN E., NOVOTNY E., ROHR L., 1948. Zur colorimetrischen Bestimmung der Phosphorsäre.Chem. Ber. 81, 438-441.

BARMAN, T.E., 1970. Purification and properties of bovine milk glyco-α-lactalbumin. Biochim. Biophys. Acta 214 : 242-244.

BELL K., HOPPER K.E., Mc KENZIE H.A., MURPHY W.H., SHAW D.C., 1970. A comparison of bovine α-lactalbumin A and B of Droughtmaster. Biochim. Biophys. Acta, 214, 437-447.

BELL K., Mc KENZIE H.A., SHAW D.C., 1968. Amino-acid composition and peptide maps of β-lactoglobulin variants. Biochim. Biophys. Acta, 154, 284-294.

BERNARDI G., 1973. In methods in enzymology, vol XXVII, p. 471 (Eds C.H.W. Hirs and S.N. Timasheff) New-York : Academic Press.

BIGELOW C.C., 1967. On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure. J. Theor. Biol. 16, 187-211.

. . . / . . .

BINGHAM E.W., FARRELL H., 1974. Casein kinase from the Golgi apparatus of lactating mammary gland. J. Biol. Chem. 11, 3647-3651.

BINGHAM E.W., FARRELL H., 1977. Phosphorylation of casein by the lactating mammary gland. A review. J. Dairy Sci. 60 : 1199-1207.

BLOCK R.J., DURRUM E.L., ZWEIG G.A., 1962. Manual of paper chromatography and paper electrophoresis. Academic Press Inc. New-York, 133.

BLOOMFIELD V.A., MEAD R.J., 1975. Structure and stability of casein micelles. J. Dairy Sci. 58, 592-601.

BRAUNITZER G., CHEN R., SCHRANK B., STANGL A., 1972. Automatische Sequenzanalyse eines Proteins (β-lactoglobulin AB). Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 353, 832-834.

BREW K., CASTELLINO F.J., VANAMAN T.C.,R.L. HILL, 1970. The complete amino-acid sequences of bovine α-lactalbumin. J. Biol. Chem. 245 : 4570-4582.

BRIGNON G., 1979. Thèse d'Université. Détermination de la structure primaire de la caséine α_{S2} bovine. Nouvelles évidences concernant le code de phosphorylation des caséines.

BRIGNON G., RIBADEAU-DUMAS B., 1973. Localisation dans la chaîne polypeptidique de la β-lactoglobuline bovine de la substitution Glu/Gln différenciant les variants génétiques B et D. FEBS Lett., 33, 73-76.

BRIGNON G., RIBADEAU-DUMAS B., MERCIER J-C., PELISSIER J-P., 1977. Complete amino acid sequence of bovine α_{S2}-casein. FEBS Lett. 76, 274-279.

BRIGNON G., RIBADEAU-DUMAS B., MERCIER J-C.,1976. Premiers éléments de structure primaire des caséines α_{S2} bovines. FEBS Lett. 71, 111-116.

BYLUND D.B., HUANG T., 1976. Decomposition of phosphoserine and phosphothreonine during acid hydrolysis. Analyt. Biochem. 73, 477-485.

CANFIELD R.E., ANFINSEN C.B., 1963. In the proteins (edited by H. Neurath), Academic Press Inc., New-York, p. 319.

COHEN-SOLAL M.C. , BERNARD J-L., 1973. Miniature thin-layer chromatography of phenylthiohydantoin amino-acids. Application of automatic Edman degradation. J. Chromatogr. 80, 140-143.

CREAMER L.K., RICHARDSON B.C., 1975. A new variant of β-casein. New Zealand J. of Dairy Sci. and Technol., 10, 170-171.

DAS B.C.,LEDERER E;, 1971. In new techniques in amino acids, peptide and protein analysis (Niederwieser A et Pataki G., Ed) p. 175. Ann. Arbor Science

DAVIES D.T., LAW A.J.R., 1977. An improved method for the quantitative fractionation of casein mixtures using ion-exchange chromatography. J. Dairy Res. 44, 213-221.

DAYHOFF M.O., 1972,1978. Atlas of Protein sequences and structure (DAYHOFF, M.O., Ed), Vol. 5, Washington, National biomedical Research Foundation.

DELFOUR A., ALAIS C., JOLLES P., 1966. Structure of cow's κ-casein glycopeptide : The N-terminal octadecapeptide. Chimia 20, 148-150.

. . . / . . .

DEWAN, R.K., CHUDGAR A., BLOOM FIELD V.A., MORR C.V., 1974. Size distribution and solvation of casein micelles in bovine milk containing α_{s1}-casein A. J. Dairy Sci., 57, 394-398.

DI STASIO L., MERLIN P., 1979. A new κ casein variant in cattle. Proceedings of the XVIth International Conference on Animal Blood Groups and Biochemical Polymorphism. II.

DOI H.. IBUKI F., KANAMORI M., 1979. Heterogeneity of reduced bovine κ casein. J. Dairy Res., 62, 195-203.

EBNER K.E., F. SCHANBACHER, 1974. Biochemistry of lactose and related carbohydrates. Page 77 in Lactation. A comprehensive treatise. Vol. II B.L. LARSON and V.R. SMITH, ed. Academic Press, New York, NY.

EIGEL W.N., 1977. Formation of γ_1-A^2, γ_2-A^2 and γ_3A caseins by in vivo proteolysis of β-casein A^2 with bovine plasmin. Intern. J. Biochem. 8, 187-192.

FOURNET B., FIAT A.M., ALAIS C., JOLLES P., 1979. Cow κ-casein : structure of the carbohydrate portion. Biochim. Biophys. Acta, 576, 339-346.

FOURNET B., FIAT A.M., MONTREUIL J., JOLLES P., 1975. The sugar part of κ-caseins from cow milk and colostrum and its microheterogeneity. Biochimie 57, 161-165.

GAYE P., HOUDEBINE L.M., 1975. Isolation and characterization of casein m RNA s from lactating ewe mammary glands. Nucleic Acid Res., 2, 707-722.

GORDON W.G., GROVES M.L., GREENBERG R., JONES S.B., KALAN E.B., PETERSON R.F., TOWNEND R.E., 1972. Probable identification of γ- TS -, R-and S-caseins as fragments of β-casein. J. Dairy Sci., 55, 261-263.

GREENBERG R., GROVES M.L., PETERSON R.F., 1976. Amino terminal sequence and location of phosphate groups of the major human casein. J. Dairy Sci. 59 (6) 1016-1018.

GROSCLAUDE F., 1974. Analyse génétique et biochimique du polymorphisme électrophorétique des caséines α_{s1}, β et κ chez les bovins (Bos taurus) et les zébus (Bos indicus). Thèse de Doctorat d'Etat es-sciences, Université de Paris VII.

GROSCLAUDE F., 1975. Variants génétiques des protéines du lait de vaches mongoles. Etudes mongoles, Cahier du Centre d'Etudes mongoles, Laboratoire d'Ethnologie, Université de Paris X - Nanterre, 6, 81-83.

GROSCLAUDE F., 1979. Polymorphism of milk proteins : some biochemical and genetical aspects. Proceedings of the XVIth International Conference on Animal Blood Groups and Biochemical polymorphism. Vol. I.

GROSCLAUDE F., GARNIER J., RIBADEAU-DUMAS B., JEUNET R., 1964. Etroite dépendance des loci contrôlant le polymorphisme des caséines α_s et β . C.R. Hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris 259, 1569-1571.

. . . . / . . .

GROSCLAUDE F., JOUDRIER P., MAHE M.F., 1978. Polymorphisme de la caséine α_{s2} bovine : étroite liaison du locus α_{s2}-Cn avec les loci α_{s1}-Cn, β-Cn et κ-Cn ; mise en évidence d'une délétion dans le variant α_{s2}-CnD. Ann. Génét. Sél. anim., 10, 313-327.

GROSCLAUDE F., MAHE M-F., MERCIER J-C., RIBADEAU-DUMAS B., 1970. Localisation dans la partie NH_2-terminale de la caséine α_{s1} bovine d'une délétion de 13 acides aminés différenciant le variant A des variants B et C. FEBS Letters 11, 109-111.

GROSCLAUDE F., MAHE M.F., MERCIER J.C., RIBADEAU-DUMAS B., 1972 b. Localisation des substitutions d'acides aminés différenciant les variants A et B de la caséine κ bovine. Ann. Génét. Sél. anim., 4, 515-521.

GROSCLAUDE F., MAHE M.F., MERCIER J.C., 1974 a. Comparaison du polymorphisme génétique des lactoprotéines du zébu et des bovins. Ann. Génét. Sél. anim. 6, 305-329.

GROSCLAUDE F., MAHE M.F., MERCIER J.C., BONNEMAIRE J., TEISSIER J.H., 1976 a. Polymorphisme des lactoprotéines de bovinés népalais. I. Mise en évidence, chez le Yak, et caractérisation biochimique de deux nouveaux variants : β-lactoglobuline D_{Yak} et caséine α_{s1}E. Ann. Génét. Sél. anim., 8, 461-479.

GROSCLAUDE F., MAHE M.F., MERCIER J.C., BONNEMAIRE J., TEISSIER J.H., 1976 b. Polymorphisme des lactoprotéines de bovinés népalais. II. Polymorphisme des caséines " $\alpha_s$mineures" ; le locus α_{s2}-Cn est-il lié aux loci α_{s1}-Cn, β-Cn et κ-Cn ?. Ann. Génét. Sél. anim., 8, 481-491.

GROSCLAUDE F., MAHE M.F., VOGLINO G.F., 1974 b. Le variant βE et le code de phosphorylation des caséines bovines. FEBS Lett., 45, 3-5.

GROSCLAUDE F., MERCIER J.C., RIBADEAU-DUMAS B., 1973. Genetic aspects of cattle casein research. Neth. Milk Dairy J., 27, 328-340.

GROSCLAUDE F., PUJOLLE J., RIBADEAU-DUMAS B., 1965. Déterminisme génétique des caséines κ du lait de vache ; étroite liaison du locus κ-Cn avec les loci α_{s1}-Cn et β-Cn. C.r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, 261, 5229-5232.

GROSCLAUDE F., PUJOLLE J., RIBADEAU-DUMAS B., GARNIER J., 1966. Analyse génétique du groupe de loci de structure synthétisant les caséines bovines. In. Polymorphismes biochimiques des animaux, Institut National de la Recherche Agronomique, 415-420.

GROVES M.L., 1960. The isolation of a red protein from milk. J. Amer. Chem. soc. 82, 3345-3350.

GROVES M.L., GORDON W.G., KALAN E.B., JONES S.B., 1972. Composition of bovine γ-caseins A^1 and A^3, and further evidence for a relationship in biosynthesis of γ- and β-caseins. J. Dairy Sci., 55, 1041-1049.

GROVES M.L., GREENBERG R., 1977. Bovine homologue of β 2 microglobulin isolated in milk. Biochem. Biophys. Research commun.,77, 320-327.

. . . / . . .

GROVES M.L., GREENBERG R., 1978. Isolation, composition and ordering of cyanogen bromide peptides in human casein. Biochem. J., 169, 337-342.

HERSKOVITS T.T., 1966. On the conformation of caseins. Optical rotatory properties. Biochem. 5, 1018-1026.

HINES H.C., KIDDY C.A., BRUN E.W., ARAVE C.W., 1968. Linkage among cattle blood and milk polymorphisms, Genetics, 62, 401-412.

HIRS C.H.W., MOORE S., STEIN W.H., 1956. Peptides obtained by tryptic hydrolysis of performic acid-oxidized ribonuclease. J. Biol. Chem. 219, 623-641.

HOAGLAND P.D., THOMPSON M.P., KALAN E.B., 1971. Amino acid composition of α_{s3}, α_{s4} and α_{s5} caseins. J. Dairy Sci., 54, 1103-1110.

HOPPER K.E. and H.A. McKENZIE, 1973. Minor components of bovine α-lactalbumin A et B. Biochim. Biophys. Acta 295, 352-363.

HUBBARD R.W., et KREMEN D., 1964. Increased sensitivity of accelerated amino acid ion exchange chromatography. Fed. Proc. 23, 372.

JENNESS R., 1978 HRI/IDF Milk. Proteins symposium, Ayr, Ecosse.

JOLLES P., ALAIS C., JOLLES J., 1961. Etude comparée des caseino-glycopeptides formés par action de la présure sur les caséines de vache, de brebis, et de chèvre. Biochim. Biophys., Acta, 51, 309-314.

JOLLES P., ALAIS C.,JOLLES J., 1962. Amino-acid composition of κ casein and terminal amino acids of κ and Para κ casein. Arch. Biochim. Biophys., 98, 56-57.

JOLLES J., ALAIS C., JOLLES P., 1968. The tryptic peptide with the rennin-sensitive linkage of cow's κ-casein. 168, 591-593.

JOLLES J., ALAIS C., JOLLES P., 1970. Chemical structure studies of cow κ-casein: study of the soluble tryptic peptides. Helv. Chim. Acta, 53, 1918-1926.

JOLLES J., FIAT A.M., ALAIS C., JOLLES P., 1973. Comparative study of cow and sheep κ caseinoglycopeptides : determination of the N-terminal sequences with the sequencer and location of sugars. FEBS Lett., 30, 173-176.

KANAMORI M., KAWAGUCHI N., IBUKI F., DOI H., 1980. Attachment sites of carbohydrate moieties to peptide chain of bovine κ-casein from normal milk. Agric. Biol. Chem. 44, 1855-1861.

KESSLER E., BREW K., 1970. The whey proteins of pig's milk. Isolation and characterization of a β-lactoglobulin. Biochim. Biophys. Acta 200, 449-458.

KIDDY C.A., JOHNSTON J.O., THOMPSON M.P., 1964. Genetic polymorphism in α_s casein variation. J. Dairy Sci, 47, 147-151.

KIDDY C.A., Mc CANN R.E., THATCHER W.W., 1968. Gene frequencies in milk protein polymorphisms in dairy cattle. Immunogenet. Lett., 5, 150-152.

KIDDY C.A.,PETERSON R.F., KOPFLER F.C., 1966. Genetic control of the variants of ß-casein A. J. Dairy Sci. 49, 742. (Abstract).

KING J.W. B., ASCHAFFENBURG P., KIDDY C.A., THOMPSON M.P., 1965. Non-independent occurrence of α_{s1}-and β-casein variants of cow's milk. Nature, 206,424.

. . . / . . .

LARSEN B., GRUCHY C.L., MOUSTGAARD J., 1974. Studies on blood groups and polymorphic protein systems in Jersey cattle on the isle of Jersey. Acta Agric., Scand., 24, 99-110.

LARSEN B., THYMANN W., 1966. Studies on milk protein polymorphism in Danish cattle and the interaction of the controlling genes. Acta vet. scand., 7, 189-205.

LESLIE R.B., IRONS L., CHAPMAN D., 1969. High resolution nuclear magnetic resonance studies of α_{s1}, β and κ-caseins. Biochim. Biophys. Acta, 188,237-246.

LI F.H.F., GAUNT S.N., 1972. A study of genetic polymorphisms of milk β-lactoglobulin, α_{s1}-casein, β-casein and κ-casein in five dairy breeds. Biochem. Genet., 6, 9-20.

LINDERSTROM-LANG, K.V., 1929. Studies on casein. On the fractionation of casein C.R. Travaux Lab. Carlsberg 17 (1), 1-116.

LINDERSTROM-LANG K., KODAMA S., 1925. Studies on casein. I. On the solubility of casein in hydrochloric acid. C.r. Trav. Lab. Carlsberg, 16, 1-47.

LIPMANN F., 1933. Uber der Bindung der Phosphorsäure in phosphorproteinen. Biochemische zeitschrift 262, 3-8, 9-13.

Mac CLUER, 1965. Cité par SHAW C.R. Electrophoretic variation in enzymes. Science, 149, 936-943.

MACHA J., MULLEROVA Z., 1968. Milk protein polymorphism of cattle breeds in Czechoslovakia. XIème Congrès européen sur les Groupes sanguins et le Polymorphisme biochimique des animaux. D.R. W. Junk N.V. Publishers, The Hague, 247-252.

MACHA J., MULLEROVA Z., 1969. A contribution to the study of associations between loci controlling cow's milk protein synthesis. Acta Univ.Agric. Fac. Agron. 17, 139-147.

MacKINLAY A.G., WAKE R.G., 1965. Fractionation of S-carboxymethyl κ-casein and characterization of the components. Biochim. Biophys., Acta 104,167-180.

MacKINLAY A.G., WEST D.W., MANSON W., 1977. Specific casein phosphorylation by a casein kinase from lactating bovine mammary gland. Eur. J.Biochem. 76, 233-243.

MANSON W., ANNAN W.D., 1971. The structure of a phosphopeptide derived from β-casein. Arch. Biochem. Biophys. 145, 16-26.

MANSON W., ANNAN W.D., BARNES G.K., 1976. α_{s0}-casein : its preparation and characterization. J. Dairy Res. 43, 133-150.

MANSON W., GROLAN T., ANNAN W.D., 1977. Bovins α_{s0}-casein : a phosphorylated homologue of α_{s1}-casein. Eur. J. Biochem., 78, 411-417.

MATOBA T., HAYASHI R., HATA T., 1970. Isolation of bitter peptides from tryptic hydrolysate of casein and their chemical structure. Agr. Biol. Chem., 34, 1235-1243.

. . . / . . .

MATOBA T., NAGAYASU C., HAYASHI R., HATA T., 1969. Bitter peptides in tryptic hydrolysate of casein. Agr. Biol. Chem. 33, 1662-1663.

MATSUBARA H., SINGER A., SASAKI R., JUKES T.H., 1965. Observations on the specificity of a thermostable bacterial protease "thermolysin". Biochem. Biophys. Res. Comm. 21, 242-247.

McKENZIE H.A., 1971. Milk proteins Vol. 1 et 2, Academic Press, New-York.

MELLANDER O., 1939. Elektrophoretische Untersuchung von Casein. Biochem.Z. 300, 240-245.

MERCIER J.C., 1981. Phosphorylation of caseins, present evidence for an amino-acid triplet code post translationally recognized by specific kinases. Biochimie 63, 1-17.

MERCIER J.C., BRIGNON G., RIBADEAU-DUMAS B., 1973. Structure primaire de la κ caséine B bovine. Séquence complète. Eur. J. Biochem. 35, 222-235.

MERCIER J.C., GAYE P., 1980. Study of secretory lactoproteins : primary structures of the signals and enzymatic processing. Annals of the New-York Academy of Sciences 343, 232-251.

MERCIER J.C., GROSCLAUDE F., RIBADEAU-DUMAS B., 1971. Structure primaire de la caséine α_{s1} bovine. Séquence complète. Eur. J. Biochem., 23, 41-51.

MERCIER J.C., GROSCLAUDE F., RIBADEAU-DUMAS B., 1972. Primary structure of bovine caseins. A review, Milchwissenchaft, 27, 402-408.

MERCIER J.C., MAUBOIS J.L., POZNANSKI S., RIBADEAU-DUMAS B., 1968. Fractionnement préparatif des caséines de vache et de brebis par chromatographie sur DEAE cellulose, en milieu urée et 2-mercaptoéthanol. Bull. Soc. Chim.. biol., 50, 521-530.

NEELIN J.M., 1964. Variants of κ-casein revealed by improved starch gel electrophoresis. J. Dairy. Sci, 47, 506-509.

NOELKEN N., REIBSTEIN M., 1968. Conformation of β-casein B. Arch. Biochem. Biophys. 123, 397-402.

OSTERBERG R., 1966. Phosphorylated peptides, study of primary structure and metal complexity. Almquist et Wiksells, Uppsala.

PETERSON R.F., 1963. High resolution of milk proteins obtained by gel electrophoresis. J. Dairy Sci., 45, 1136-1139.

PETERSON R.F., KOPFLER F.C., 1966. Detection of new types of β casein by polyacrylamide gel electrophoresis at acid pH : a proposed nomenclature. Biochem. Biophys. Res. Commun., 22, 388-392.

PISANO J.J., BRONZERT J.T., BREWER H., 1972. Advances in the gas chromatographic analysis of amino-acid phenyl-and methylthiohydantoins. Anal. Biochem. 45, 43-59.

PUJOLLE J., RIBADEAU-DUMAS B., GARNIER J., PION R., 1966. A study of κ -casein components. I. Preparation. Evidence for a common C-terminal sequence. Biochem. Biophys.Res.Commun., 25, 285-290.

.../...

RIBADEAU-DUMAS B., BRIGNON G., GROSCLAUDE F., MERCIER J.C., 1972. Structure primaire de la caséine β bovine. Séquence complète. Eur. J. Biochem., 25, 505-514.

RIBADEAU-DUMAS B., GROSCLAUDE F., MERCIER J.C., 1970. Localisation dans la chaîne peptidique de la casein β bovine de la substitution His/Gln différenciant les variants génétiques A2 et A3.C.R. Hebd. Séanc. Acad. Sci. (Paris), 270, 2369-2372.

RIBADEAU-DUMAS B., GROSCLAUDE F., MERCIER J-C., 1975. Primary structure of the polymorphs of the caseins. Mod. Probl. Paediat. 15, 46-62.

RICHARDSON C., MERCIER J-C., 1979. The primary structure of the ovine β caseins. Eur .J. Biochem.99, 285-297.

SCHMIDT D.C., 1964. Starch gel electrophoresis of κ casein. Biochim. Biophys., Acta, 90, 411-414.

SCHMIDT D.G., 1969. On the association of α_{s1}-casein. Thesis, H. VEEMAN, RONEN, N.V., WAGENINGEN.

SCHMIDT D.G., BOTH P., KONING P.J., DE, 1966. Fractionation and some properties of κ-casein variants. J. Dairy Sci., 49, 776-782.

SCHMIDT D.G., PAYENS T.A.J., 1964. Differences in aggregation behaviour of the genetic variants of α_s-casein. Neth milk dairy J., 18, 108-111.

SHROEDER W.A., JONES R.I., CORMICK J., Mc CALLA K., 1962. Chromatographic separation of peptides on ion exchange resins. Anal. Chem., 34, 1570-1575.

SINGH V.N., DAVE S.S., VENKITASUBRAMANIAN T A, 1967. Effect of puromycin in vitro on the phosphorylation of precursor protein in lactating rat mammary gland slices. Biochem. J. 104,48c-50c.

SMITH I., 1953. Colour reactions on paper chromatograms by a dipping technique Nature, 171, 43-44.

SPACKMAN D.H., STEIN W.H., MOORE S., 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Anal. Chem., 30, 1190-1206.

THOMPSON M.P., 1971, in milk proteins. Chemistry and molecular biology (Mc KENZIE, H.A., ed.) 2, 117-173.

THOMPSON M.P., GORDON W.G., PEPPER L., GREENBERG R., 1969 b. Amino acid composition of β-caseins from the milks of Bos taurus and Bos indicus cows : a comparative study. Comp. Biochem. Physiol., 30, 91-98.

THOMPSON M.P., KIDDY C.A., 1964. Genetic polymorphism in caseins of cow's milk. III. Isolation and properties of α_{s1}-caseins A, B and C. J. Dairy Sci. 47, 626-632.

TURKINGTON R.W., TOPPER Y.J., 1966. Casein biosynthesis : evidence for phosphorylation of precursor proteins. Biochim. Biophys. Acta, 127, 366-372.

VERDIER C.H., 1953. The isolation of phosphothreonine from bovine casein. Acta, Chem. Scand. 7, 196-200.

. . . / . . .

VOGLINO G.F., CARIGNANO I., 1975. Association between α_{s1}-, β - and κ -casein loci in two Italian cattle breeds. Anim. Blood Grps biochem. Genet., 6, 175-183.

VREEMAN H.J., BOTH P., BRINKHUIS J.A., Van Der SPEK O., 1977. Purification and some physico chemical properties of bovine κ -casein. Biochim. Biophys. Acta, 491, 93-103.

WAKE R.G., 1957. The action of rennin on casein. Austr. J. Sci. 20, 147-150.

WAKE R.G., BALDWIN R.L., 1961. Analysis of casein fractions by zone electrophoresis in concentrated urea. Biochim. Biophys. Acta, 47, 225-239.

WAUGH D.F., CREAMER L.K., SLATTERY C.W., FRESDNER G.W., 1970. Core polymer of casein micelles. Biochemistry 9, 786-795.

WAUGH D.F., VON HIPPEL P.H., 1956. κ -casein and the stabilization of casein micelles. J. Am. Chem. Soc. 78, 4576-4582.

WHEELCOCK J.V., SINKINSON G., 1969. Identification of 2-acetamino-2-deoxy-D galactose in bovine. κ-casein. Biochim. Biophys. Acta, 194, 597-599.

WHITNEY R., BRUNNER J.R., EBNER K.E., FARRELL H.M., JOSEPHSON R.V., MORR C.V., SWAISGOOD H.E., 1976. Nomenclature of the proteins of cow's milk. Fourth revision (Report) J. Dairy Sci. 59, 795.

WOYCHIK J.H., 1964. Polymorphism in κ-casein of cow'smilk. Biochem. Biophys. Res. Commun., 16, 267-271.

YAMADA S., ITANO H.A., 1966. Phenanthrenequinone as analytical reagent for arginine and other monosubstituted guanidines. Biochim. Biophys. Acta, 130, 538-540.

ZITTLE C.A., CUSTER J.H., 1963. Purification and some of the properties of α_s -casein and κ-casein. J. Dairy Sci., 46, 1183-1188.